

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj, 2018.

Marija Radman

804/N

**PRIMJENA NIR
SPEKTROSKOPIJE U DETEKCIJI
GLUTENA KAO
KONTAMINANTA HRANE**

Rad je izrađen u Laboratoriju za mjerenja, regulaciju i automatizaciju na Zavodu za procesno inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr.sc. Jasenke Gajdoš Kljusurić. Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te uz pomoć dr.sc. Tamare Jurina.

Zahvaljujem se svojoj mentorici prof. dr. sc. Jasenki Gajdoš Kljusurić na posvećenom vremenu i strpljenju te ohrabrenju i razumijevanju. Također hvala dr.sc. Tamari Jurina na ljubaznosti i pomoći tijekom provedbe ovog rada.

Najviše od svega hvala Danijelu na velikoj podršci i ljubavi koju mi je pružio kada mi je bilo najpotrebnije.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za procesno inženjerstvo
Laboratorij za mjerenja, regulaciju i automatizaciju

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Nutricionizam

PRIMJENA NIR SPEKTROSKOPIJE U DETEKCIJI GLUTENA KAO KONTAMINANTA HRANE

Marija Radman, 804/N

Sažetak: Kada je riječ o kontaminaciji hrane, kontaminacija glutenom posebno dolazi do izražaja. Kontaminirana može biti i hrana koja prirodno ne sadrži gluten, pa čak i hrana s oznakom „bez glutena“. Zbog zaštite zdravlja osoba koje ne smiju konzumirati gluten, od iznimne je važnosti određivanje i pravilno označavanje bezglutenske hrane. Cilj ovog rada bio je ispitati primjenu NIR spektroskopije u detekciji glutena u riži, rižinom i kukuruznom brašnu te kukuruznoj krupici. U tu svrhu korištene su dvije vrste pšeničnih brašna i dodavane u hranu u postotku od 5% do 30%. Pripremljene su tri vrste uzoraka, a svi uzorci mjereni su u rasponu valnih duljina od 904 nm do 1699 nm. NIR spektroskopija je kombinirana s analizom glavnih komponenta (PCA) koja je korištena za otkrivanje sličnosti i razlika između uzoraka. U svrhu razvijanja modela predikcije postotka brašna u uzorcima, korištena je linearna regresija te je dobiveno 9 primjenjivih modela s koeficijentom determinacije iznad 0,9. Nadalje, praćena je vodljivost i ukupne otopljene tvari (TDS) kako bi se istražile razlike u uzorcima. Svi uzorci, osim kombinacije kukuruznog i oštrog brašna, pokazali su linearni rast vodljivosti i TDS-a povećanjem postotka brašna. Da bi se utvrdio sadržaj glutena u pšeničnim brašnima i uzorcima, sadržaj vlažnog glutena određen je metodom ručnog ispiranja, a sadržaj suhog glutena sušenjem vlažnog glutena. Svjetlosna mikroskopija korištena je za određivanje veličine i oblika čestica u korištenim sirovinama.

Ključne riječi: NIR spektroskopija, gluten, pšenično brašno, kukuruz, riža

Rad sadrži: 65 stranica, 36 slika, 6 tablica, 62 literaturna navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: Prof. dr. sc. Jasenka Gajdoš Kljusurić

Pomoć pri izradi: Dr. sc. Tamara Jurina

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Doc.dr.sc. Davor Valinger
2. Prof.dr.sc. Jasenka Gajdoš Kljusurić
3. Prof.dr.sc. Ines Panjkota Krbavčić
4. Doc.dr.sc. Maja Benković (zamjena)

Datum obrane: srpanj, 2018.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Process Engineering
Laboratory for Measurement, Regulation and Automatisatation

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Nutrition

APPLICATION OF NIR SPECTROSCOPY IN GLUTEN DETECTION AS A CONTAMINANT IN FOOD

Marija Radman, 804/N

Abstract: When it comes to food contamination, gluten contamination is particularly pronounced. Contaminated can also be foods that naturally do not contain gluten, and even food labeled "gluten-free". For the health of people who should not consume gluten, it is important to determine and correctly label gluten-free foods. The aim of this work was to determine the applicability of the NIR spectroscopy for detection of gluten in rice, rice flour, corn flour and corn grits. For that purpose, two types of wheat flours were used and added to food in a percentage from 5% to 30%. Three types of samples were made, and all samples were recorded from 904 nm to 1699 nm. NIR spectroscopy was combined with principal component analysis (PCA) which is used to detect similarities and differences between samples. In order to develop model that predicts percentage of the flour in the samples, linear regression was used, which resulted with 9 applicable models, with the coefficient of determination above 0,9. Furthermore, conductivity and total dissolved solids (TDS) were monitored to determine changes in samples. All samples, except combination of corn flour and hard wheat flour, showed linear growth of conductivity and TDS with the increase of flour percentage. To determine gluten content in wheat flours and samples, wet gluten content was determined by manual method and dry gluten content by drying wet gluten. Light microscopy was used to determine size and shape of particles in used materials.

Keywords: NIR spectroscopy, gluten, wheat flour, corn, rice

Thesis contains: 65 pages, 36 figures, 6 tables, 62 references

Original in: Croatian

Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) version is deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: *PhD. Jasenka Gajdoš Kljusurić, Full professor*

Technical support and assistance: *PhD. Tamara Jurina*

Reviewers:

1. PhD. *Davor Valinger*, Assistant professor
2. PhD. *Jasenka Gajdoš Kljusurić*, Full professor
3. PhD. *Ines Panjkota Krbavčić*, Full professor
4. PhD. *Maja Benković*, Assistant professor (substitute)

Thesis defended: July, 2018.

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. GLUTEN	3
2.2. POREMEĆAJI IZAZVANI KONZUMACIJOM GLUTENA	4
2.2.1. Celijakija	4
2.2.2. Dermatitis herpetiformis	6
2.2.3. Glutenska ataksija	7
2.2.4. Alergija na pšenicu	7
2.2.5. Preosjetljivost na gluten	8
2.3. ŽITARICE U PREHRANI	10
2.3.1. Izvori glutena u prehrani	11
2.3.2. Prehrambeni unos glutena	11
2.4. BEZGLUTENSKA PREHRANA	12
2.4.1. Kontaminacija bezglutenske hrane	14
2.5. VIBRACIJSKA SPEKTROSKOPIJA	15
2.5.1. NIR spektroskopija	15
3. EKSPERIMENTALNI DIO	17
3.1. MATERIJAL	17
3.1.1. Priprema uzoraka	17
3.2. METODE	20
3.2.1. NIR spektroskopija	20
3.2.2. Određivanje vlažnog i suhog glutena	21
3.2.3. Vodljivost i ukupne otopljene tvari	24
3.2.4. Svjetlosna mikroskopija	25
3.2.5. Obrada podataka	25
4. REZULTATI I RASPRAVA	27
4.1. SVJETLOSNA MIKROSKOPIJA	29
4.2. ODREĐIVANJE VLAŽNOG I SUHOG GLUTENA	31
4.2.1. NIR spektroskopija određivanja vlažnog glutena	31
4.2.1.2. Analiza glavnih komponenata	32

4.2.2. Količina vlažnog i suhog glutena u oštrom i glatkom pšeničnom brašnu.....	33
4.3. NIR SPEKTROSKOPIJA UZORAKA KONTAMINIRANIH GLUTENOM	34
4.3.1. Analiza glavnih komponenata	39
4.3.1.1. PCA analiza praškastih uzoraka	41
4.3.1.2. PCA analiza tekućih uzoraka snimanih sandom	43
4.3.2. Linearni regresijski modeli	46
4.3.2.1. Linearni regresijski modeli praškastih uzoraka	47
4.3.2.2. Linearni regresijski modeli tekućih uzoraka snimanih sandom	49
4.4. VODLJIVOST I UKUPNE OTOPLJENE TVARI	51
5. ZAKLJUČCI	57
6. LITERATURA	59

1. UVOD

Gluten se definira kao proteinska frakcija pšenice, raži, ječma i zobi ili njihovih križanih sorti i njihovih derivata, koja u nekih osoba može dovesti do poremećaja kao što su: celijakija, dermatitis herpetiformis, glutenska ataksija, alergija na pšenicu i preosjetljivost na gluten. Ponekad se iz definicije glutena izostavlja zob jer je njena toksičnost još uvijek kontroverzna. Veći problem kod zobi zapravo je njena česta kontaminacija pšenicom, raži ili ječmom. Proizvodi koji prirodno sadrže gluten u velikoj su mjeri zastupljeni u prehrani opće populacije, a gluten može biti i „skriven“ u prerađenoj hrani gdje se dodaje kao aditiv zbog poboljšanja određenih karakteristika proizvoda. Kada je riječ o kontaminaciji hrane, kontaminacija glutenom najviše dolazi do izražaja. Kontaminirani mogu biti i proizvodi koji prirodno ne sadrže gluten pa čak i oni s oznakom „bez glutena“ na deklaraciji. To predstavlja veliki problem osobama koje iz zdravstvenih razloga ne smiju konzumirati gluten. Zbog zaštite zdravlja oboljelih osoba kojima je jedina terapija bezglutenska prehrana, iznimno je važno pravilno označavanje hrane koje još uvijek nije prisutno.

Osnovni cilj istraživanja je mogućnost primjene NIR spektroskopije u detekciji glutena kao kontaminanta hrane. NIR spektroskopija je vibracijska spektroskopska tehnika koju karakterizira brzo i točno mjerenje za koje nije potrebna posebna priprema uzoraka, a temelji se na apsorpciji elektromagnetskog zračenja u području valnih duljina od 780 nm do 2500 nm. Glavni nedostatak NIR spektroskopije je njena ovisnost o drugim referentnim metodama. Apsorpcijske vrpce u NIR spektrima manje su informativne, a u mnogim slučajevima dolazi i do njihova preklapanja, stoga je dobivene podatke potrebno obraditi multivarijatnim metodama analize.

Za istraživanje su odabrane sirovine koje prirodno ne sadrže gluten: riža, rižino brašno, kukuruzna krupica i kukuruzno brašno te su iste kontaminirane različitim postotcima oštrog i glatkog pšeničnog brašna (5-30%). Osim praškastih uzoraka, pripremljene su i dvije vrste tekućih uzoraka. Svi uzorci mjereni su NIR spektroskopijom u rasponu valnih duljina od 904 nm do 1699 nm, a dobiveni rezultati obrađeni su metodom analize glavnih komponenata (PCA) koja omogućuje grupiranje i analizu podataka bez postavljenog fizičkog modela. Dodatno je korištena linearna regresija s ciljem razvijanja dobrog kalibracijskog modela za predikciju postotka brašna u uzorcima.

Zbog utvrđivanja sadržaja glutena u pšeničnim brašnima i kontaminiranim uzorcima, određen je vlažni gluten u oba brašna metodom ručnog ispiranja škroba te je određen sadržaj suhog

glutena. Nadalje, istraženo je kako povećanje mase brašna u uzorcima utječe na vrijednosti vodljivosti i ukupnih otopljenih tvari, te je zbog utvrđivanja izgleda i veličine čestica u sirovinama, provedena svjetlosna mikroskopija.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. GLUTEN

Codex Alimentarius standard (1979 rev. 2008) gluten definira kao proteinsku frakciju pšenice, raži, ječma i zobi ili njihovih križanih sorti i njihovih derivata, na koju su neke osobe intolerantne i koja je netopiva u vodi i 0,5 M NaCl.

Zrno pšenice sadrži 8% do 15% proteina od kojih 10% do 15% čine albumini i globulini, a 85% do 90% čini gluten (Biesiekierski, 2017). Prema nekim autorima postotak glutena u zrnu je nešto niži, a kreće se od 70% do 80% (Scherf i sur., 2016; Catassi i sur., 2017). Gluten je kompleksna smjesa proteina, većinom glijadina i glutenina koji se nazivaju prolaminima zbog visokog sadržaja aminokiselinskih ostataka glutamina (38%) i prolina (20%) (Biesiekierski, 2017). Glijadini su sastavljeni od monomernih jedinica, a glutenini od polimernih i karakterizira ih netopivost u vodi. Glijadini su topivi u vodenim otopinama alkohola (npr. 60%-tnog etanola), a glutenini u razblaženim kiselinama i bazama ili tek nakon redukcije disulfidnih veza kojima su povezani agregirani proteini. Glijadini se mogu podijeliti prema razlikama u primarnoj strukturi na: α/β -, γ - i ω -glijadine. Nadalje, α/β - i γ -glijadini su sumporom bogati, a ω -glijadini sumporom siromašni. Glutenini se dijele na dvije grupe: glutenine niske molekulske mase i glutenine visoke molekulske mase (Wieser, 2007; Navarro i sur., 2017). Prolamini slični glijadinu u raži, ječmu i zobi nazivaju se sekalin, hordein i avenin, redom (Elli i sur., 2017).

Gluten se nalazi u zrnu žitarica iz tribusa *Triticeae* koji uključuje: pšenicu (*Triticum spp.*), ječam (*Hordeum vulgare*), i raž (*Secale cereale*). Zob je iz iste potporodice (*Pooideae*), ali pripada drugom tribusu (*Aveneae*). Prolamini zobi imaju neke drukčije karakteristike od prolamina žitarica iz tribusa *Triticeae* i još uvijek se raspravlja o njihovoj toksičnosti (Navarro i sur., 2017). Neke od vrsta pšenice koje sadrže gluten su: durum pšenica (*Triticum durum*) koja se koristi za proizvodnju tjestenine, obična ili krušna pšenica (*Triticum aestivum*) koja se koristi za proizvodnju kruha i pekarskih proizvoda te pir, emmer, einkorn i khorasan pšenica (Kamut). Izvor glutena su i pšenični derivati kao što su bulgur i sejtan te tritikale ili pšenoraž, vrsta dobivena križanjem pšenice i raži (Elli i sur., 2017).

Za agregaciju glijadina i glutenina i stvaranje strukture glutena važne su nekovalentne vodikove, ionske i hidrofobne veze (Wieser, 2007). Tijekom pripreme tijesta gluten veže vodu i tvori glutensku mrežu koja ima svojstvo i zadatak da zadržava CO₂ koji nastaje tijekom fermentacije, stoga je gluten direktno odgovoran za teksturu i volumen kruha (Mrvčić i sur.,

2011). Gluten je zbog svojih funkcija važan i za kvalitetu tijesta koje se koristi kod pripreme drugih pekarskih proizvoda poput tjestenine, kolača, peciva i keksa. Svojstva glutena ovise o omjeru glutenina i glijadina i o njihovim interakcijama. Svaka komponenta ima drukčije funkcije važne za određivanje visko-elastičnih svojstava (Biesiekierski, 2017). Pročišćeni hidratizirani glijadini doprinose viskoznosti i rastezljivosti tijesta, dok hidratizirani glutenini pridonose čvrstoći i elastičnosti (Wieser, 2007). Raženo brašno ne sadrži gluten koji kod pšeničnog brašna tvori glutensku mrežu odgovornu za vezanje vode i zadržavanje plinova. Tu ulogu u raženom brašnu imaju pentozani čija se topljivost i bubrenje povećava u kiselom mediju (Mrvčić i sur., 2011). Zbog manjeg sadržaja kvalitetnog glutena u raženom brašnu, ponekad se ono miješa s dijelom pšeničnog brašna za dobivanje proizvoda bolje konzistencije. Ječmeno i zobeno brašno koriste se znatno rjeđe u pripremi proizvoda od dizanog tijesta i to gotovo uvijek uz dodatak pšeničnog brašna (Skenderija, 2010).

2.2. POREMEĆAJI IZAZVANI KONZUMACIJOM GLUTENA

Visoki sadržaj prolina čini gluten otpornim na degradaciju gastrointestinalnim enzimima i tako omogućuje da veliki imunogenični glutenski peptidi dopru do površine sluznice i potaknu razvoj upalne reakcije (Čuković-Čavka i sur., 2012).

Godinama se gluten povezivao samo s celijakijom za koju se smatralo da je rijetka bolest prisutna samo u Europi. Danas je poznato da gluten, osim što u genetski predisponiranih osoba može dovesti do razvoja celijakije, može izazvati i cijeli niz drugih različitih poremećaja (Mišak, 2014). Prema konsenzusu stručnjaka objavljenom 2012. godine poremećaji izazvani konzumacijom glutena mogu se podijeliti u tri osnovna oblika: autoimuni (celijakija, dermatitis herpetiformis i glutenska ataksija), alergijski (alergija na pšenicu) i vjerojatno imunološki posredovani (preosjetljivost na gluten) (Sapone i sur., 2012).

2.2.1. Celijakija

Celijakija ili glutenska enteropatija kronična je autoimuna bolest koju izaziva gluten u osoba s genskom predispozicijom, a karakterizira je doživotna nepodnošljivost glutena. Raširena je u cijelom svijetu i javlja se u oko 1% populacije (Čuković-Čavka i sur., 2012). Dugo se smatralo da se celijakija javlja gotovo isključivo u ranoj dječjoj dobi, međutim,

epidemiološkim i serološkim istraživanjima utvrđeno je da se može javiti u svakoj životnoj dobi pa čak i u petom ili šestom desetljeću života (Tack i sur., 2010). Liječenje podrazumijeva strogu bezglutensku prehranu, a poremećeni imunosni odgovor ne može se izliječiti privremenim izostavljanjem glutena iz prehrane (Čuković-Čavka i sur., 2012).

Tri su ključna faktora potrebna za nastanak bolesti: gluten, genska predispozicija i imunosni odgovor (Čuković-Čavka i sur., 2012). Svi proteini glutena (glijadin i glutenin, hordein, sekalin i avenin) imaju vlastite skupine toksičnih i imunogenih peptida (epitopa) s različitim imunogenostima. Međutim, poznato je da su glijadinski peptidi najtoksičniji i brojni, osobito izvedeni iz α - i γ -glijadina. Najjači i najčešći odgovor stečenog imunosnog sustava uzrokuje fragment duljine od 33 aminokiseline iz α -glijadina (Balakireva i Zamyatnin, 2016). Poznato je da je celijakija snažno povezana s alelima humanog leukocitnog antigena (eng. *human leukocyte antigen*-HLA) koji su odgovorni za približno 35% rizika od razvoja bolesti. Većina bolesnika (približno 95%) nositelji su HLA-DQ2 haplotipa, a preostali bolesnici nositelji su ili HLA-DQ8 ili dijela HLA-DQ2 haplotipa. Osobe koje nemaju celijakiju također mogu biti nosioci rizičnog genotipa. Od 30% pripadnika bijele rase koji su DQ2 i/ili DQ8 pozitivni, obolijeva samo 3% nositelja, moguće stoga što velik dio genetičke podložnosti čine još i danas nepoznati geni izvan HLA sustava (Čuković-Čavka i sur., 2012; Ludvigsson i sur., 2013; Sapone i sur., 2012; Starčević Čizmarević i sur., 2015). Uzimanje glutena u oboljelih rezultira upalom sluznice tankog crijeva, atrofijom crijevnih resica te povećanjem propusnosti crijeva. Oštećenja nastala u tankom crijevu mogu dovesti do malapsorpcije nekih važnih nutrijenata kao što su željezo, folna kiselina, kalcij i vitamini topljivi u mastima (Biesiekierski, 2017; Panjkota Krbavčić, 2013).

Klinička slika celijakije vrlo je raznolika. Klinički simptomi mogu biti od blagih, jedva uočljivih, do jako izraženih i odmah prepoznatljivih. Na varijabilnost kliničke slike, osim dobi, utječe količina glutena u prehrani, spol i genetička predispozicija (Starčević Čizmarević i sur., 2015). Zbog sve veće neujednačenosti u klasifikaciji kliničke slike celijakije i prezentacije poremećaja izazvanih konzumacijom glutena, skupina eksperata iz sedam zemalja izdala je 2013. godine „Oslo definicije“ koje se odnose na različite kliničke oblike celijakije i s celijakijom povezane termine (Ludvigsson i sur., 2013). U bolesnika s *klasičnim* tipom celijakije bolest se najčešće javlja između 6. i 24. mjeseca života, a manifestira se simptomima malapsorpcije uz prisutnost dijareje, steatoreje, gubitka tjelesne mase ili zastoja u

rastu. *Neklasični* tip celijakije javlja se kasnije, a kliničku sliku karakterizira odsutnost malapsorpcije, pri čemu je najčešće prisutan jedan od simptoma bolesti, ali ne dijareja i steatoreja. *Simptomatska* celijakija podrazumijeva široki spektar simptoma, crijevnih (bol u trbuhu, nadutost i dijareja) i izvancrijevnih (neurološki simptomi i umor), povezanih s ingestijom glutena. Oštećenje sluznice prisutno je i kod *subkliničkog* oblika celijakije, gdje su simptomi još odsutni ili je riječ o izvancrijevnoj simptomatologiji bez crijevne manifestacije bolesti. Subklinički oblik naziva se još i *tihom* ili *asimptomatskom* celijakijom. Postoji i *potencijalna (latentna)* celijakija koja je stanje povećanog rizika za nastup bolesti. Osobe imaju normalan nalaz biopsije crijevne sluznice uz pozitivnu serologiju (Ludvigsson i sur., 2013; Starčević Čizmarević i sur., 2015).

U bolesnika kod kojih je bolest prepoznata i liječena bezglutenskom prehranom, jednaka je stopa obolijevanja i smrtnosti od teških bolesti kao u zdravih ljudi. Međutim, oštećenje sluznice tankog crijeva koje dugo traje može rezultirati razvojem malignih bolesti kao što su limfomi i adenokarcinomi tankog crijeva (Čuković-Čavka i sur., 2012; Panjkota Krbavčić, 2013). Celijakija se češće javlja uz druge autoimune bolesti i urođene sindrome, a povezanost se dijelom tumači zajedničkom genetičkom predispozicijom. Najčešće bolesti povezane s celijakijom su: šećerna bolest tip 1, autoimune bolesti štitnjače i jetre, upalne bolesti crijeva (Chronova bolest i ulcerozni kolitis), Sjogrenova bolest te IgA deficijencija (Starčević Čizmarević i sur., 2015).

U dijagnostici celijakije pet je važnih elemenata koji omogućavaju adekvatno provođenje dijagnostičkog postupka: klinička sumnja na celijakiju, serološki testovi, patohistološka analiza sluznice tankog crijeva, genska analiza DQ2 i DQ8-heterodimera i pozitivan klinički odgovor na bezglutensku prehranu (Čuković-Čavka i sur., 2012).

2.2.2. Dermatitis herpetiformis

Dermatitis herpetiformis, poznat kao i Duhringova bolest, kožna je manifestacija celijakije koju karakterizira osip i patognomoični IgA depoziti. Prevalencija je mala, oko 1:2000 do 1:10.000, a može se javiti u bilo kojoj dobi, ipak rjeđe u ranoj dječjoj i starijoj odrasloj dobi. Prosječna dob javljanja je oko 40. godine života. (Mišak, 2014; Scherf i sur., 2016). Klinički dominantan simptom je jaki svrbež i pečenje kože. Osip ima karakterističnu

simetričnu raspodjelu, najčešće su zahvaćeni laktovi i nadlaktice (u više od 90% bolesnika), ali mogu biti zahvaćeni i bedra, koljena, ramena, sakralna regija, lice, vlasište, vrat i trup. Iako samo 10% bolesnika ima probavne tegobe i to najčešće blage, atrofija resica sluznice tankog crijeva prisutna je u 65-75% bolesnika. Dijagnoza se temelji na nalazu biopsije kože te na serološkim nalazima tipičnim za celijakiju. Nakon postavljanja dijagnoze savjetuje se bezglutenska prehrana čak i kada se sluznica tankog crijeva čini uredna budući da je osip kod dermatitisa herpetiformisa osjetljiv na gluten (Sapone i sur., 2012).

2.2.3. Glutenska ataksija

Glutenska ataksija ranije se definirala kao idiopatska sporadična ataksija s pozitivnim serološkim markerima glutenske senzitacije. Predstavlja jednu od neuroloških manifestacija celijakije, autoimuna je bolest, a karakterizira ju oštećenje cerebeluma koje rezultira ataksijom. Patogeneza glutenske ataksije nije do kraja jasna, ali se pretpostavlja da postoji križna reakcija između antigenih epitopa na Purkinjeovim stanicama i glutena. Svi bolesnici imaju ataksiju hoda, a većina ima ataksiju ekstremiteta i dokaz atrofije cerebeluma. Vidljivi nistagmus i očni znakovi cerebelarne disfunkcije vidljivi su u i do 80% slučajeva. Manje od 10% bolesnika ima neke od probavnih simptoma, a trećina ima enteropatiju na nalazu biopsije sluznice tankog crijeva. Bez obzira na nalaz biopsije, bolesnicima koji nemaju drugi uzrok ataksije, a imaju pozitivan nalaz antiglijadinskih protutijela, treba savjetovati strogu bezglutensku prehranu uz redovito praćenje i provjeru negativizacije protutijela čemu obično treba 6 do 12 mjeseci. Stabilizacija ili čak poboljšanje ataksije nakon godine dana uvjerljiva je potvrda da bolesnik ima glutensku ataksiju. Međutim, odgovor na bezglutensku prehranu ovisi o duljini trajanja ataksije prije postavljanja dijagnoze jer je gubitak Purkinjeovih stanica u cerebelumu uslijed duge izloženosti glutenu ireverzibilan, stoga je važno što ranije započeti liječenje (Mišak, 2014; Sapone i sur., 2012; Scherf i sur., 2016).

2.2.4. Alergija na pšenicu

Žitarice koje sadrže gluten i njihovi proizvodi spadaju u skupinu 11 najčešćih alergena podrijetlom iz hrane. Iako i druge žitarice mogu uzrokovati alergijske reakcije, najčešće se spominje alergija na pšenicu (HAH, 2009). Alergija na pšenicu je nepoželjna imunološka IgE

posredovana reakcija na proteine pšenice. Može se javiti u svakoj dobi, ali najčešće pogađa djecu koja u kasnijoj životnoj dobi mogu razviti toleranciju. Procjenjuje se da je alergija na pšenicu prisutna u 0,4% opće populacije (Kucek i sur., 2015) i u 6% djece do 3 godine (HAH, 2009). Nakon ingestije glutena, alergija se kod djece manifestira urtikarijom, bronhalnom opstrukcijom, mučninom i bolovima u trbuhu, a u nekim slučajevima i anafilaksijom. U kasne manifestacije (nakon oko 24 sata) javljaju se probavni simptomi i atopijski dermatitis (Mišak, 2014). Na dijagnozu upućuju kožni testovi i in vitro specifični IgE testovi, dok test opterećenja hranom služi kao potvrdni test. Alergija se liječi izbjegavanjem pšeničnog brašna u prehrani (Picarelli i sur., 2013).

Ovisno o uvjetima izloženosti alergenu i imunološkom mehanizmu, alergija na pšenicu može se podijeliti na klasičnu nutritivnu alergiju koja pogađa kožu, gastrointestinalni ili respiratorni trakt; vježbanjem uzrokovanu anafilaksiju ovisnu o pšenici (eng. *wheat-dependent, exercise-induced anaphylaxis*, WDEIA); okupacijsku (pekarsku) astmu i rinitis te kontaktnu urtikariju (Sapone i sur., 2012). Osim proteina glutena (najčešće tipova ω -glijadina), alergijske reakcije mogu uzrokovati i drugi proteini pšenice. Kod pekarske astme proteini bezglutenskog brašna i γ - i α/β glijadini uzrokuju respiratorne alergijske reakcije nakon inhalacije brašna, a kod vježbanjem uzrokovane anafilaksije ovisne o pšenici (WDEIA) glavni alergen je ω 5-gliadin (Balakireva i Zamyatnin, 2016). Pekarska astma i rinitis alergijski su odgovori na inhalaciju pšeničnog i drugog brašna i prašine te su zastupljeni među radnicima u pekarskoj industriji (Sapone i sur., 2012). WDEIA je sindrom u kojem ingestija pšenice nakon čega slijedi fizička aktivnost može rezultirati anafilaktičkim odgovorom (De Punder i Pruimboom, 2013).

2.2.5. Preosjetljivost na gluten

Osim bolesnika s celijakijom i alergijom na gluten postoje i osobe koje reagiraju na gluten, ali kod njih se ne mogu dokazati ni alergijski ni autoimuni mehanizmi, stoga se oni općenito označavaju kao ne-celijakična preosjetljivost na gluten ili jednostavno preosjetljivost na gluten. Prema definiciji, to je stanje u kojem ingestija hrane koja sadrži gluten dovodi do jedne ili više imunoloških, morfoloških i simptomatskih manifestacija u osoba kod kojih je isključena celijakija i alergija na gluten (Sapone i sur., 2012; Nijeboer i sur., 2013). Epidemiološki podaci za ovaj poremećaj značajno se razlikuju od studije do studije, navodeći

prevalenciju u općoj populaciji koja varira od 0.63% do 6% (Volta i sur., 2013). Bolest je najčešća u odrasloj populaciji, osobito u žena dobi od 30 do 40 godina (Volta i sur., 2014).

Klinički bolest može podsjećati na celijakiju ili alergiju na gluten i može se očitovati brojnim crijevnim (bol u trbuhu, nadutost, dijareja, dispepsija, flatulencija) i/ili izvancrijevnim simptomima (glavobolja, slabost, letargija, mentalna konfuzija, anksioznost, depresija) koji se javljaju kratko nakon ingestije glutena i poboljšavaju se uvođenjem bezglutenske prehrane (Mišak, 2014; Volta i sur., 2014). Osim toga, crijevni simptomi bolesti često se preklapaju sa simptomima sindroma iritabilnog crijeva (Balakireva i Zamyatnin, 2016). Za razliku od drugih poremećaja izazvanih konzumacijom glutena, kod poremećaja preosjetljivosti na gluten bolesnici imaju negativne imuno-alergološke testove na pšenicu, negativne serološke testove za celijakiju te uredan nalaz biopsije sluznice tankog crijeva, ali mogu imati pozitivna protutijela na gliadin. Dijagnoza se postavlja kriterijem isključivanja jer za sada ne postoje laboratorijski biomarkeri specifični za preosjetljivost na gluten. Treba učiniti i opterećenje glutenom, a poželjno bi bilo provesti ga dvostruko slijepo i placebo kontrolirano, kako bi se odredilo kojim će bolesnicima koristiti bezglutenska prehrana te kada ona nije opravdana (Mišak, 2014).

Patogeneza preosjetljivosti na gluten još uvijek nije razjašnjena. Za razliku od celijakije, bolest se može pojaviti i u osoba bez specifičnog HLA profila (Mišak, 2014), otprilike 50% bolesnika je HLA-DQ2 ili HLA-DQ8 pozitivno (Balakireva i Zamyatnin, 2016). Nadalje, važno je napomenuti da i druge komponente pšenice mogu pridonijeti razvoju simptoma bolesti. Catassi i sur. (2017) osim glutena navode i pšenične amilaza-tripsin inhibitore, aglutinin pšeničnih klica te fermentabilne oligo-, di- i monosaharide i poliole. Carroccio i sur. (2014) predložili su korištenje prikladnijeg termina „ne-celijakična preosjetljivost na pšenicu“, međutim, ni taj termin nije idealan jer ne uključuje ječam i raž koji također imaju ulogu u razvoju simptoma bolesti (Verbeke, 2018).

2.3. ŽITARICE U PREHRANI

Žitarice su biljne vrste iz porodice trava (*Poaceae*) u koje se ubraja: pšenica (uključujući krupnik/pir i khorasan), raž, ječam, zob, kukuruz, riža, proso, sirak i pšenoraž (tritikale) te heljda iz porodice dvornika (*Polygonaceae*) (Pravilnik, 2016). Žitarice su prije svega dobar izvod energije zbog visokog sadržaja ugljikohidrata (škroba), osim toga, u prosjeku sadržavaju 6% do 12% proteina. Žitarice i proizvodi od žitarica u velikoj su mjeri zastupljeni u svakodnevnoj prehrani pa se većina potreba za proteinima ostvaruje upravo iz tog izvora. Ipak, proteini žitarica nisu potpuni, siromašni su izvor esencijalne aminokiseline lizin koja se može nadomjestiti kombinacijom žitarica s namirnicama koje su bogate lizinom, primjerice mahunarkama ukoliko je unos proteina ograničen na biljne izvore. Žitarice ne sadrže velike količine masti, prosječno 2% do 4% (Jirka Alebić, 2008; Ćurić, 2013).

Žitarice i proizvodi žitarica mogu se podijeliti na cjelovite i prerađene (rafinirane). Razlika se temelji na nutritivnom sastavu koji proizlazi iz načina obrade žitarica. Cjelovite žitarice podrazumijevaju puno zrno koje se sastoji od tri dijela: omotača (vanjski dio), endosperma (unutarnji dio) i klice. Endosperm je bogat škrobom i proteinima dok je omotač bogat prehrambenim vlaknima koja se povezuju s brojnim pozitivnim učincima na zdravlje kao što je smanjeni rizik od razvoja dijabetesa, pretilosti i bolesti srca i krvožilnog sustava te očuvanje zdravlja gastrointestinalnog sustava. Osim prehrambenih vlakana, omotač sadrži i vitamine B skupine te većinu mineralnih tvari prisutnih u zrnu. Klica je također bogata vitaminima B skupine te sadrži značajne količine vitamina E, nezasićenih masnih kiselina i različitih fitokemikalija s antioksidativnim, antiupalnim i antikancerogenim djelovanjem. Kod prerađenih (rafiniranih) žitarica uklanja se vanjski omotač i klica što rezultira smanjenjem nutritivne vrijednosti. Iako su rafinirane žitarice i njihovi proizvodi popularni među potrošačima, u njima ostaje samo 25% do 30% vrijednih nutrijenata iz cjelovitih žitarica, stoga se preporuča da barem polovica dnevnog unosa namirnica iz skupine žitarica i proizvoda od žitarica bude iz cjelovitih žitarica. Osim toga, s obzirom na veliki izbor proizvoda od žitarica koji se nalaze na tržištu, potrebno je obratiti pažnju na one koji sadrže velike količine šećera, masti i soli npr. kekse, kolače, lisnata tijesta, zaslađene žitarice za doručak i slane grickalice te ograničiti njihov unos (Jirka Alebić, 2008; Ćurić, 2013).

Pšenica, riža i kukuruz su najčešće konzumirane žitarice od kojih se pšenica, kroz veliki broj različitih kultivara, uzgaja na najširem području svijeta. Najpoznatija je obična ili krušna pšenica (*Triticum aestivum*) koja se često koristi za opis mnogih drugih vrsta i genotipova

pšenice. Veliki dio uzgojene pšenice koristi se za proizvodnju kruha i drugih pekarskih proizvoda i tjestenine (Sapone i sur., 2012; Biesiekierski, 2017).

2.3.1. Izvori glutena u prehrani

Pšenica i proizvodi od pšenice glavni su izvori glutena koji se širom svijeta konzumiraju u velikim količinama. Zbog svoje dostupnosti, primamljive teksture i okusa, konzumiraju se svakodnevno te mogu biti dio svakog obroka u danu (Biesiekierski, 2017; Čuković-Čavka i sur., 2012). Uz pšenicu i proizvode od pšenice, izvori glutena su i žitarice ječam i raž, njihovi proizvodi te svi derivati i križane sorte dobivene od navedenih triju žitarica (Elli i sur., 2017). Osim toga, gluten se zbog svojih svojstava široko primjenjuje u prehrambenoj industriji pa može biti prisutan u procesiranoj hrani gdje se dodaje zbog zadržavanja vlage te poboljšanja teksture i okusa proizvoda (Biesiekierski, 2017; Čuković-Čavka i sur., 2012). Zbog toga izvor glutena može biti i hrana koja nije na bazi žitarica npr. mesne prerađevine (kobasice, hrenovke); proizvodi na bazi ribe i morskih organizama (panirani riblji štapići); vegetarijanske zamjene za meso te bomboni, sladoled, maslac, začini, umaci i preljevi gdje se gluten koristi kao zgušnjivač, emulgator i tvar za želiranje. Nadalje, gluten se sve više odvaja od pšenice (poznat kao „vitalni pšenični gluten“) ili modificira (poznat kao „izolirani pšenični proteini“) u svrhu poboljšanja strukture pekarskih proizvoda ili obogaćivanja brašna s niskim sadržajem proteina (Kucek i sur., 2015).

2.3.2. Prehrambeni unos glutena

Zbog brojnih izvora koji su u velikoj mjeri zastupljeni u prehrani, gluten se također konzumira u velikim količinama. Prosječni unos u Europi kreće se od 10 do 20 grama na dan dok je u dijelu populacije prisutan unos od 50 grama ili više (Mišak, 2014; Sapone i sur. 2012). Unosu najviše doprinosi pšenični kruh čija kriška sadrži približno 4 grama glutena (Biesiekierski, 2017). Unos glutena nije uvijek bio tako visok. Žitarice su se počele uzgajati prije oko 10.000 godina, a tijekom povijesti su se mijenjale i odabirale one kvalitetnije, osobito posljednjih 200 godina kada je u prvi plan stavljena kultivacija pšenice s većim udjelom glutena zbog poboljšanja tehnoloških svojstava. S evolucijskog stajališta, 10.000 godina je prekratko vrijeme za odgovarajuću prilagodbu, ali je moguće da stoljećima nije bilo

tegoba budući da je količina glutena u pšenici bila niska. Nakon što je unazad dva stoljeća znatno povećana količina glutena u pšenici, tegobe su zbog loše prilagodbe mogle postati očitije (Mišak, 2014; Sapone i sur., 2012).

2.4. BEZGLUTENSKA PREHRANA

Bezglutenska prehrana predstavlja temelj liječenja poremećaja izazvanih konzumacijom glutena. Za bolesnike s celijakijom, bezglutenska prehrana podrazumijeva potpuno isključenje svih namirnica koje sadrže gluten, a mora se provoditi strogo i doživotno jer i najmanje količine glutena mogu dovesti do oštećenja sluznice (Mišak, 2014; Sapone i sur., 2012). S obzirom na veliki broj prehrambenih proizvoda koji sadržavaju gluten, provođenje bezglutenske prehrane nije nimalo jednostavno, stoga bolesnici nerijetko dolaze u kušnju da ponovno pokušaju uzimati namirnice koje sadrže gluten. Može se dogoditi da pritom nemaju simptoma i pogrešno zaključe da im više nije potrebna bezglutenska dijeta. U tom slučaju potrebno ih je posebno upozoriti na činjenicu da i najmanje količine glutena u celijakičara dovode do patološke stimulacije crijevne sluznice i rizika od nastanka brojnih komplikacija bolesti (Čuković-Čavka i sur., 2012). Osim stroge bezglutenske prehrane, iznimno je važna i edukacija pacijenata i njihovih obitelji o samoj bolesti i liječenju bezglutenskom prehranom. Od presudne su važnosti čitanje i prepoznavanje deklaracija na prehrambenim proizvodima radi prepoznavanja prisutnosti glutena. Također je potrebno i stalno praćenje oboljelih kako bi se identificirali i liječili eventualni nutritivni deficiti (Panjkota Krbavčić, 2013).

Postoji puno namirnica koje prirodno ne sadrže gluten. Iz skupine žitarica i namirnica bogatih škrobom gluten ne sadrže: kukuruz, riža, proso, heljda, amaranth, brašno rogača, kvinoa, tapioka, manioka i krumpir. Također, sve vrste svježeg voća i povrća, kao i svježe mlijeko i mliječni proizvodi, biljna ulja te meso, riba i jaja, ne sadrže gluten. Međutim, procesirana hrana može biti izvor glutena pa je iznimno važno čitati deklaracije na prehrambenim proizvodima. Osim hrane koja prirodno ne sadrži gluten, na tržištu se nalaze bezglutenski proizvodi iz kojih je odstranjen gluten, a namijenjeni su oboljelima od celijakije i drugih poremećaja izazvanih konzumacijom glutena (Panjkota Krbavčić, 2008). Iako bezglutenska prehrana podrazumijeva terapiju oboljelim, u općoj populaciji sve je više zastupljeno mišljenje da je takva prehrana zdravija te postaje stil života pojedinaca u kojih možda nije potrebna. Aziz i sur. (2015) navode podatak da oko 5% populacije samoinicijativno prelazi na bezglutensku prehranu, dok Niland i Cash (2018) navode da skoro

jedna trećina odraslih osoba u Americi smatra korisnim redukciju ili potpuno izbacivanje glutena iz prehrane te da je 50% sportaša privrženo bezglutenskoj prehrani. Bezglutenska prehrana je sigurna čak i kad se provodi duže vrijeme, međutim, ako nije dobro balansirana, može dovesti do nutritivnih deficita, stoga je važno prije početka provođenja bezglutenske prehrane provjeriti postoji li poremećaj zbog kojeg je ista opravdana i savjetovati se s nutricionistom (Mišak, 2014). Isključenje glutena iz prehrane podrazumijeva isključenje brojnih namirnica bogatih nutrijentima. Bezglutenski proizvodi često su bogati mastima pa osobe na bezglutenskoj prehrani mogu imati veći unos zasićenih i ukupnih masti. Također, mnogi proizvodi su napravljeni od škroba i rafiniranih brašna pa mogu dovesti do deficita prehrambenih vlakana. U oboljelih od celijakije često je prisutan deficit vitamina (folne kiseline, niacina, vitamina B₁₂ i vitamina D) i minerala (željeza i kalcija). Kako bi se izbjegli nutritivni deficiti, u bezglutensku prehranu važno je uključiti adekvatne, nutritivno vrijedne zamjene npr. žitarice koje prirodno ne sadrže gluten umjesto proizvoda napravljenih od škroba i rafiniranih brašna (Elli i sur., 2017).

Catassi i sur. (2007) navode da samo 50 mg glutena na dan može napraviti mjerljive štete na sluznici tankog crijeva u oboljelih od celijakije, a kao sigurna granica preporuča se 20 mg glutena po kilogramu hrane. Veliki broj proizvoda koji su posebno prerađeni s ciljem smanjena sadržaja glutena mogu sadržavati manje količine rezidua jer je proces njihove proizvodnje tehnološki zahtjevan i skup. U svrhu informiranja potrošača o odsutnosti ili smanjenoj prisutnosti glutena u hrani donesena je Provedbena Uredba Komisije (EU) br. 828/2014 prema kojoj je izjavu „bez glutena“ dopušteno navesti samo ako je sadržaj glutena u hrani kao gotovom proizvodu manji od 20 mgkg⁻¹. Izjavu „vrlo mali sadržaj glutena“ dopušteno je navesti samo ako hrana, koja se sastoji ili sadržava jedan ili više sastojaka proizvedenih od pšenice, raži, ječma, zobi ili njihovih hibridnih vrsta koji su posebno prerađeni s ciljem smanjenja količine glutena, ne sadržava količinu glutena višu od 100 mgkg⁻¹ u gotovom proizvodu (Uredba (EU) 828, 2014).

Još uvijek nije jasno mogu li oboljeli od celijakije konzumirati zob. Unatoč brojnim studijama, uključivanje zobi u prehranu i dalje ostaje kontroverzno (Panjkota Krbavčić, 2013; Scherf i sur., 2016). Neka istraživanja pokazuju da se zob može tolerirati bez povratka bolesti, ali isto tako postoje pacijenti koji nakon uvođenja zobi u prehranu imaju tegobe tipične za celijakiju (Panjkota Krbavčić, 2013). Scherf i sur. (2016) navode da nedavne studije pokazuju kako vrlo mala grupa celijakičara ne može tolerirati zob. Veći problem od same zobi je zapravo njena česta kontaminacija pšenicom, raži ili ječmom za vrijeme žetve, prijevoza,

skladištenja ili prerade, stoga Uredba (EU) br. 828/2014 navodi kako se zob koju sadržava hrana koja se prezentira kao hrana bez glutena ili s vrlo malim sadržajem glutena mora proizvoditi, priređivati i/ili prerađivati na način kojim se sprječava kontaminacija pšenicom, raži, ječmom ili njihovim hibridnim vrstama, a količina glutena u takvoj zobi ne smije biti viša od 20 mgkg⁻¹.

2.4.1. Kontaminacija bezglutenske hrane

U procesu rada s hranom postoji opasnost od križne kontaminacije (unakrsnog zagađenja) koja posebno dolazi do izražaja kod bezglutenskih proizvoda koji su često kontaminirani glutenom (HOK, 2016). Kontaminaciji su podložni i proizvodi koji prirodno ne sadrže gluten pa, ukoliko nisu označeni, nije sigurno da su bez glutena. Postoji mogućnost da je količina glutena u tim proizvodima manja od 20 mgkg⁻¹, ali na deklaraciji nema oznake jer proizvod nije testiran. Nažalost, čak ni oznaka „bez glutena“ nije uvijek garancija da proizvod zadovoljava uvjete označavanja (Lee i sur., 2014). Verma i sur. (2017) analizirali su sadržaj glutena u 200 bezglutenskih proizvoda (uključujući i proizvode koji prirodno ne sadrže gluten) prisutnih na talijanskom tržištu. Proizvodi koji prirodno ne sadrže gluten bili su kontaminirani u većoj mjeri (16%) od označenih bezglutenskih proizvoda (9%) pri čemu su najčešće kontaminirani bili proizvodi na bazi zobi. Istraživanje u Kanadi koje su proveli Koerner i sur. (2011) pokazuje da je od 133 uzoraka zobi čak 88% kontaminirano. Lee i sur. (2014) analizirali su 78 uzoraka hrane s oznakom „bez glutena“ u SAD-u, 20.5% uzoraka nije zadovoljavalo uvjete oznake, a najčešće su bile kontaminirane žitarice za doručak. Riža i kukuruz često su zastupljeni u bezglutenskim proizvodima te su najčešće kontaminirani bezglutenski proizvodi (do 50 mgkg⁻¹) sadržavali upravo te dvije žitarice.

Kontaminacija glutenom može se dogoditi već pri samom uzgoju žitarica te u transportu, skladištenju, proizvodnji, pakiranju i distribuciji prehrambenih proizvoda. Osim prehrambenih proizvoda, glutenom mogu biti kontaminirani radni prostori, površine, uređaji, pribor i radna odjeća. Najčešće kritične točke su: skladištenje; klima uređaji, nape, pećnice i ostali kuhinjski uređaji; čistoća radnih površina, ruku i radne odjeće; pribor za kuhanje te istovremeno kuhanje bezglutenskog i glutenskog obroka (HOK, 2016).

Pravilno označavanje sadržaja glutena u hrani i sprječavanje kontaminacije bezglutenske hrane iznimno je važno zbog zaštite zdravlja oboljelih osoba kojima je jedina terapija bezglutenska prehrana.

2.5. VIBRACIJSKA SPEKTROSKOPIJA

Vibracijska spektroskopija primjenjuje se za identifikaciju molekula na temelju vibracija njihovih atoma, odnosno periodičkih promjena kuteva i međuatomskih udaljenosti. Vibracijske spektroskopske tehnike mogu se temeljiti na apsorpciji ili raspršenju elektromagnetskog zračenja, stoga razlikujemo infracrvenu odnosno Ramanovu spektroskopiju (Jednačak i Novak, 2013).

Infracrvena spektroskopija (engl. infrared spectroscopy, IR) proučava interakcije tvari i elektromagnetskog zračenja u rasponu valnih brojeva od $12\ 500\text{ cm}^{-1}$ do 10 cm^{-1} odnosno valnih duljina od $0,8\text{ }\mu\text{m}$ do $1000\text{ }\mu\text{m}$. IR-spektar pokazuje ovisnost apsorbancije ili transmitancije o valnoj duljini ili valnom broju. Područje IR-spektra može se podijeliti na blisko ($0,8\text{ }\mu\text{m}$ do $2,5\text{ }\mu\text{m}$), srednje ($2,5\text{ }\mu\text{m}$ do $25\text{ }\mu\text{m}$) i daleko ($25\text{ }\mu\text{m}$ do $1000\text{ }\mu\text{m}$). Za organske spojeve najzanimljivije je srednje područje infracrvenog spektra, gdje se nalaze vrpce karakteristične za pojedine spojeve (Jednačak i Novak, 2013).

IR spektroskopija proučava molekulске vibracije koje uključuju pomake atoma pri određenim uvjetima. Vibracije su posljedica apsorpcije elektromagnetskog zračenja u molekulima. Pritom molekula prelazi iz osnovnog stanja u pobuđeno vibracijsko stanje, što se u spektru detektira kao vrpca (Jednačak, 2013).

2.5.1. NIR spektroskopija

Near-infrared (NIR) spektroskopija temelji se na apsorpciji elektromagnetskog zračenja u području od 780 nm do 2500 nm gdje se pojavljuju vrpce viših tonova i kombinacijske vrpce među kojima su najistaknutije O-H, N-H, C-H i S-H veze tj. veze s vodikom koje pokazuju veliku neusklađenost i visoke frekvencije vibracija (Ozaki i sur., 2007).

NIR spektroskopija počela se primjenjivati 1960. godine za određivanje količine vlage u različitim vrstama zrna žitarica i mahunarki te sjemenki uljarica (Porep i sur., 2015). Danas se primjenjuje za praćenje i kontrolu fizičkih i kemijskih procesa te brzu kvalitativnu i kvantitativnu analizu spojeva koji sudjeluju u procesu (Jednaček i Novak, 2013). Osim što je brza, ova metoda ne zahtijeva posebnu pripremu uzoraka, jednostavna je, točna, može se provoditi *on-line* što štedi vrijeme i novac, ne uništava uzorak, za analizu nisu potrebne kemikalije te nije štetna za okoliš. Zbog svih tih prednosti NIR spektroskopija je popularna

metoda koja se koristi u poljoprivredi i medicini te mnogim industrijama kao što su prehrambena, farmaceutska, tekstilna i kozmetička industrija (Badr Eldin, 2011).

NIR spektroskopija se u prehrambenoj industriji koristi za kontrolu kvalitete i sigurnosti hrane, rutinski se primjenjuje u analizi sastava te funkcionalnoj i senzorskoj analizi sastojaka hrane, procesnih međuprodukata i gotovih proizvoda. U žitaricama i proizvodima od žitarica npr. keksima i kolačima koristi se za određivanje proteina, masti i vlage, a u brašnu za određivanje škroba, proteina, vode, pepela, boje i veličine zrnaca. Porep i sur. (2015) predstavili su primjenu NIR spektroskopije u *on-line* praćenju industrijskih procesa proizvodnje različitih prehrambenih proizvoda iz svih skupina namirnica. U skupini žitarica i proizvoda od žitarica koristi se za praćenje procesa miješanja tijesta za kruh (Aït Kaddour i Cuq, 2011a), dizanja tijesta i aglomeracije brašna (Aït Kaddour i Cuq, 2011b), određivanje vlage u tjestenini nakon procesa ekstruzije (De Temmerman i sur., 2007) te određivanje vlage i proteina u riži i pšenici pri rasponu valnih duljina od 840 nm do 1048 nm (Li i sur., 2013).

Glavni nedostatak NIR spektroskopije je njena ovisnost o drugim referentnim metodama. Za razliku od IR spektroskopije, vrpce u NIR-spektrima manje su informativne, a u mnogim slučajevima dolazi i do njihova preklapanja (mjerni signal je nepravilna krivulja bez pojedinih oštro izraženih apsorpcija) stoga je dobivene podatke potrebno obraditi multivarijantnim metodama analize (Jednačak i Novak, 2013). Pri ispitivanju mogućnosti korištenja NIR spektroskopije kao alternativne metode, potrebno je razmotriti mnogo faktora koji se odnose na karakteristike uzoraka, provedbu eksperimenta i analizu podataka. Koncentracija analita u uzorcima trebala bi biti iznad limita detekcije, za većinu analita je to 1% ili više. Uzorci koji se koriste za kalibraciju trebaju biti reprezentativni, te trebaju biti poznate sve informacije o provedenom eksperimentu npr. veličina uzoraka i čestica, homogenost, temperatura i radno okruženje, kako bi se analiza budućih uzoraka s nepoznatom koncentracijom analita provela na isti način (Badr Eldin, 2011).

Najvažniji korak u NIR spektroskopiji je razvijanje dobrog kalibracijskog modela koje uključuje računanje i regresijsku jednadžbu temeljenu na NIR spektru i poznatoj koncentraciji analita. Izrađeni model se kasnije koristi za predviđanje budućih nepoznatih koncentracija tog analita u uzorcima (Badr Eldin, 2011). Za razvijanje modela koriste se kemometrijske multivarijantne metode analize, a najčešće su: analiza glavnih komponenata (PCA), regresija glavnih komponenata (PCR) i regresija parcijalnih najmanjih kvadrata (PLSR) (Ozaki i sur., 2007).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJAL

Osnovni cilj istraživanja je mogućnost primjene NIR spektroskopije u detekciji glutena, stoga je korišteno 6 osnovnih sirovina (tablica 1.) koje su podijeljene u dvije skupine: one koje sadrže gluten (pšenično oštro brašno tip 400 i pšenično glatko brašno tip 550) te one koje prirodno ne sadrže gluten (bijela dugozrnata riža, rižino brašno, kukuruzna krupica i kukuruzno brašno).

Proizvodi su kupljeni u trgovini i skladišteni u laboratoriju. Pšenična brašna bila su pakirana u standardnoj papirnatoy ambalaži iz koje je lako moguće rasipanje te su, zbog sprječavanja neželjene kontaminacije glutenom, skladištena odvojeno od ostalih proizvoda. Od svih proizvoda koji prirodno ne sadrže gluten, jedino je rižino brašno imalo oznaku „bez glutena“.

Tablica 1. Oznake osnovnih sirovina

OSNOVNE SIROVINE	
Pšenično oštro brašno	O*
Pšenično glatko brašno	G*
Riža	R
Rižino brašno	Rb
Kukuruzna krupica	Kk*
Kukuruzno brašno	Kb

* negdje je, zbog jasnije oznake uzorka, umjesto velikog slova navedeno malo i obrnuto. Te izmjene ne mijenjaju značenje oznake.

3.1.1. Priprema uzoraka

Svaka sirovina koja ne sadrži gluten (R, Rb, Kk i Kb) kontaminirana je glatkim i oštrim brašnom pa je ukupno 8 kombinacija npr. kombinacije za rižu su riža+oštro brašno i riža+glatko brašno. Kod svake kombinacije je pripremljeno 6 uzoraka ovisno o postotku dodanog brašna (5%, 10%, 15%, 20%, 25% i 30%).

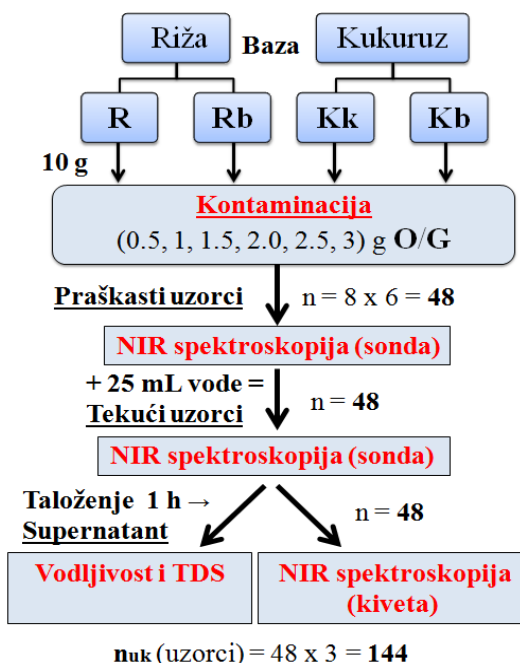
Najprije je odvagano po 10 g sirovine koja ne sadrži gluten npr. riža u 6 posudica u koje je zatim dodano 0.5g, 1g, 1.5g, 2g, 2.5g i 3g pšeničnog brašna npr. glatko. Tako pripremljeni praškasti uzorci promiješani su drvenim štapićem i mjereni NIR mjernom metodom pomoću sonde.

Nakon mjerenja u 6 prethodno pripremljenih uzorka dodano je po 25 mL vodovodne vode, uzorci su ponovno promiješani i mjereni na isti način kao prethodni.

Nakon mjerenja, prethodno pripremljeni tekući uzorci ponovno su promiješani te su ostavljeni da se talože otprilike 1 h. Nakon taloženja uzet je dio odvojenog supernatanta iz svakog od 6 uzoraka i otpipetiran u kivete. Ti uzorci prvo su mjereni na konduktometru gdje su očitane vrijednosti vodljivosti i ukupnih otopljenih tvari, a nakon toga su mjereni NIR mjernom metodom u kiveti.

U tablici 2. su kao primjer prikazane oznake svih uzoraka pripremljenih od riže kontaminirane glatkim brašnom. Cijeli postupak (slika 1) ponovljen je za uzorke ostalih 7 kombinacija te zbog usporedbe, za 6 osnovnih sirovina, dakle za 10 g riže, rižinog brašna, kukuruzne krupice i kukuruznog brašna bez kontaminacije pšeničnim brašnima i za 10g oštrog i glatkog pšeničnog brašna (Slika 2). Oznake uzoraka pripremljenih od osnovnih sirovina prikazane su u tablici 3.

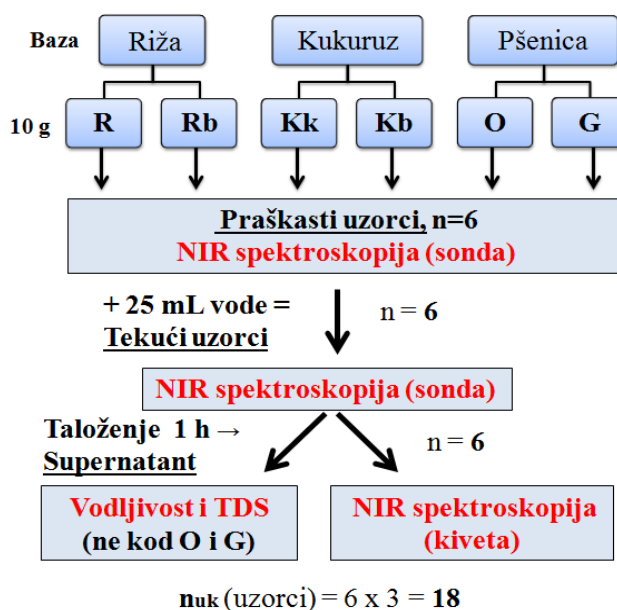
Ukupno je pripremljeno 144 uzoraka kombinacija s određenim postotkom brašna (18 za svaku kombinaciju) i 18 uzoraka osnovnih sirovina.



Slika 1. Shematski prikaz procesa pripreme i mjerenja kontaminiranih uzoraka

Tablica 2. Primjer oznaka uzoraka pripremljenih za kombinaciju riža+glatko pšenično brašno

POSTOTAK BRAŠNA (%)	PRAŠKASTI UZORCI	TEKUĆI UZORCI (snimani sondom)	TEKUĆI UZORCI (snimani u kiveti)
5	R5g	TR5g	kiR5g
10	R10g	TR10g	kiR10g
15	R15g	TR15g	kiR15g
20	R20g	TR20g	kiR20g
25	R25g	TR25g	kiR25g
30	R30g	TR30g	kiR30g



Slika 2. Shematski prikaz procesa pripreme i mjerenja uzoraka osnovnih sirovina

Tablica 3. Oznake uzoraka pripremljenih od osnovnih sirovina

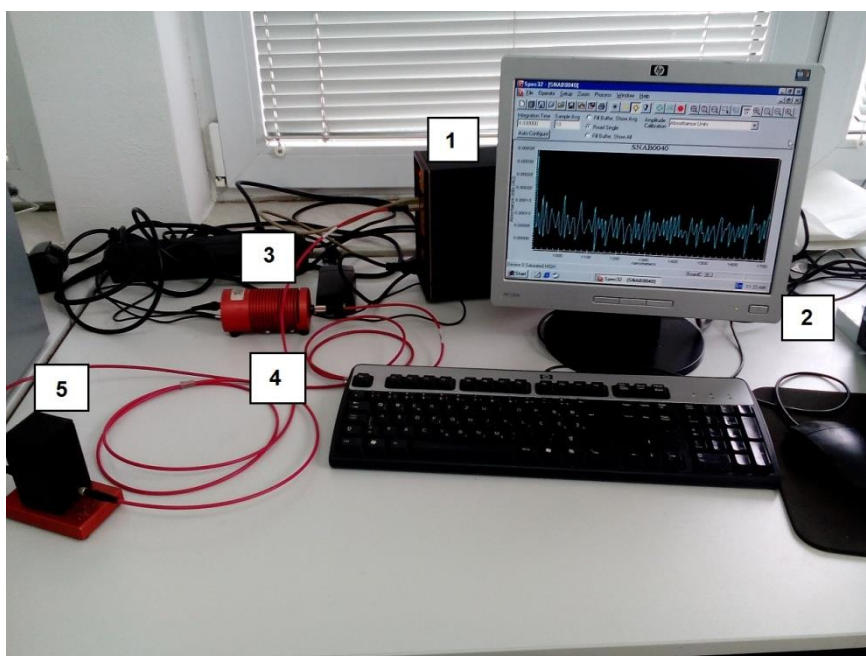
OSNOVNA SIROVINA	PRAŠKASTI UZORCI	TEKUĆI UZORCI (snimani sondom)	TEKUĆI UZORCI (snimani u kiveti)
Riža	R	TR	KiR
Rižino brašno	Rb	TRb	KiRb
Kukuruzna krupica	Kk	TKk	KiKk
Kukuruzno brašno	Kb	TKb	KiKb
Glatko brašno	G	TG	KiG
Oštro brašno	O	TO	KiO

3.2. METODE

3.2.1. NIR spektroskopija

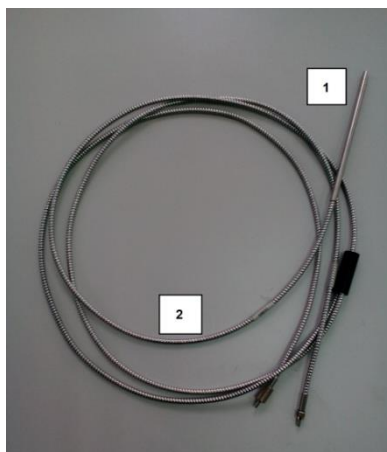
NIR spektri svih pripremljenih uzoraka snimljeni su u rasponu valnih duljina od 904 nm do 1699 nm na NIR spektrometru Control Development, Inc., NIR-128-1.7-USB/6.25/50 μ m s instaliranim Control Development softverom SPEC 32 (slika 3).

Praškasti i prvi tekući uzorci (praškasti uzorci s vodom) snimani su pomoću sonde (slika 4.), dok su drugi tekući uzorci (odvojeni supernatant nakon taloženja prvih tekućih uzoraka) snimani u kiveti (slika 3).



Slika 3. NIR instrument povezan s računalom

(1) NIR instrument, (2) Računalo s instaliranim SPEC 32 softverom, (3) izvor svjetlosti, (4) optički kablovi, (5) mjesto za snimanje uzoraka u kiveti



Slika 4. Sonda (1), Optički kablovi (2)

Spec32 program, instaliran na računalo koje je povezano s NIR instrumentom, omogućuje snimanje apsorpcijskog spektra i transmitance. U istraživanju je sniman apsorpcijski spektar uzoraka. Praškasti i prvi tekući uzorci prije snimanja su promiješani drvenim štapićem pa su stavljeni u tamnu kutiju zbog zaštite od okolne svjetlosti, zatim je u njih uronjena sonda i snimljen spektar. Prije snimanja tekućih uzoraka u kiveti izvršena je kalibracija nakon koje je snimanje bez uzorka pokazivalo titranje oko nule.

Rezultat snimanja uzorka je NIR spektar u rasponu valnih duljina od 904 nm do 1699 nm u ovisnosti o apsorbanciji. Za svaki uzorak snimljeno je 3 spektra i pohranjeno u datoteku na računalo. Te datoteke prebačene su u Excel gdje je svaki spektar predstavljao vrijednosti apsorbancije za sve valne duljine u navedenom rasponu. Za svaki uzorak izračunata je srednja vrijednost 3 snimljena spektra kako bi se smanjila njihova različitost.

3.2.2. Određivanje vlažnog i suhog glutena

Količina i kvaliteta proteina glutena utječe na viskozno-elastična svojstva tijesta. Drugim riječima, što je veća količina i kvaliteta vlažnog glutena, dobiveno tijesto je rastezljivo i elastično, a tijekom fermentacije zadržava plin i osigurava dobar volumen i raspored šupljina pekarskog proizvoda (Mlinar i sur., 2017).

Vlažni gluten formiraju u vodi netopivi proteini glijadin i glutenin, a princip određivanja vlažnog glutena temelji se na ispiranju škroba iz kuglice koja je formirana od brašna i otopine natrijevog klorida.

U istraživanju je tijekom određivanja vlažnog glutena u oštroj i glatkoj pšeničnoj brašni sniman NIR spektar pojedinih uzoraka zbog utvrđivanja promjena nastalih u procesu. Postupak je ponovljen za oba brašna kako bi se sušenjem dobivenih uzoraka vlažnog glutena odredio sadržaj suhog glutena u brašnima te zbog moguće usporedbe s rezultatima NIR spektroskopije. Tijekom ponovljenog postupka nije sniman proces, već samo vlažni i suhi gluten.

Pribor:

- Porculanska zdjelica
- Stakleni štapić
- Staklena čašica od 100 mL
- 2 staklene čaše od 2 L
- Cjediljka
- 4 aluminijske posudice za sušenje

Aparatura:

- Analitička vaga (Sartorius, TE214S-OCE, Njemačka)
- NIR spektrometar (Control Development, Inc., NIR-128-1.7-USB/6.25/50 μ m, SAD)
- Računalo s instaliranim Control Development softverom SPEC 32
- Laboratorijski sušionik (Inko, ST605, Hrvatska)
- Eksikator (Normax, Portugal)

Reagensi:

- Natrijev klorid za pripremu 2%-tne otopine

Postupak:

Prvo je pripremljena 2%-tna otopina natrijeva klorida otapanjem 40 g kuhinjske soli u 2 L vodovodne vode. Nakon toga je u porculansku zdjelicu odvagano 10 g pšeničnog brašna (oštroj ili glatkoj), snimljen je NIR spektar brašna pa je u zdjelicu dodano 5 mL pripremljene 2%-tne otopine natrijevog klorida. Navedena smjesa homogenizirana je staklenim štapićem, formirana u kuglicu koja je potom snimljena.

Nakon toga je kuglica ispirana 2%-tnom otopinom natrijevog klorida pa pod tankim mlazom vode iz slavine. Kuglica je bila na lijevom dlanu i prstima desne ruke lagano pritiskana, a

ispiranje se vršilo nad cjediljkom kako bi se eventualno otkinuti komadići tijesta mogli skupiti. U tom procesu su snimani uzorci dobiveni ispiranjem nakon svakih 500 mL 2%-tne otopine natrijeva klorida do potrošene 2 L tj. 4 snimana uzorka, pa su snimani uzorci nakon ispiranja sa svakih 500 mL vode do potrošene 1,5 L tj. 3 snimana uzorka.

Nastavljeno je ispiranje do potpunog nestanka škroba tj. kad kapljica istisnuta iz ispiranog uzorka nije zamutila vodu u čaši. Taj uzorak (vlažni gluten) snimljen je i izvagan nakon čega je cijeli opisani postupak ponovljen za drugo pšenično brašno. U tablici 4. navedene su oznake uzoraka mjerenih NIR spektroskopijom nastalih u procesu određivanja vlažnog glutena glatkog i oštrog pšeničnog brašna.

Tablica 4. Oznake uzoraka mjerenih NIR spektroskopijom nastalih u procesu određivanja vlažnog glutena oštrog i glatkog pšeničnog brašna.

1G	Glatko brašno
2G	Kuglica od glatkog brašna s dodanih 5 mL 2% ot. NaCl
3G-6G	Snimanje nakon svakih 500 mL 2% ot. NaCl (uk. 2 L)
7G-9G	Snimanje nakon svakih 500mL vode (uk. 1,5 L)
10G_vl	Vlažni gluten na kraju ispiranja

* Kod određivanja vlažnog glutena oštrog brašna u oznakama je „o“ umjesto „G“

Postupak ispiranja ponovljen je za oba brašna, ali tijekom tog postupka nije sniman cijeli proces. Prvo su snimljeni uzorci vlažnog glutena dobiveni iz oštrog (vlO) i glatkog pšeničnog brašna (vlG), a nakon snimanja, svaki uzorak vlažnog glutena podijeljen je na dvije otprilike jednake kuglice koje su izvagane i stavljene na sušenje na 130 °C četiri sata. Nakon sušenja su uzorci stavljeni na hlađenje u eksikator jedan sat te su izvagani i snimljeni.

Postotak vlažnog glutena u oštrom i glatkom pšeničnom brašnu izračunat je prema formuli:

$$\% \text{ vlažni gluten} = (m(\text{vlažni gluten}) * 100) / m(\text{brašno})$$

Postotak suhog glutena u oštrom i glatkom pšeničnom brašnu izračunat je prema formuli:

$$\% \text{ suhi gluten} = (\% \text{ vlažni gluten} * m(\text{suhi gluten})) / m(\text{vlažni gluten za analizu})$$

Postotak suhog glutena izračunat je za svaku paralelu te je izračunata srednja vrijednost paralela za oštro i glatko pšenično brašno.

Iz količine vlažnog i suhog glutena dobivene drugim postupkom, izračunat je postotak vlažnog i suhog glutena u uzorcima kontaminiranim s 0.5g, 1g, 1.5g, 2g, 2.5g i 3g oštrog i glatkog brašna uzimajući u obzir promjenu mase uzorka nakon dodatka brašna.

3.2.3. Vodljivost i ukupne otopljene tvari

Električna vodljivost je sposobnost otopine da provodi električnu energiju i koristi se u fizikalnom opisu svojstva tvari. Svi ioni prisutni u otopini pridonose naboju kroz senzor i na taj način, mjerenju vodljivosti, stoga se vodljivost može koristiti kao mjera koncentracije iona prisutnih u uzorku. Prilikom mjerenja vodljivosti mogu se koristiti i drugi parametri, kao što je TDS (eng. Total Dissolved Solids) tj. ukupne otopljene tvari. TDS je metoda koja se koristi za određivanje krute tvari u otopini jer su krutine u otopini u većini slučajeva prisutne kao ioni (Hanna Instruments, 2017).

Vodljivost i ukupne otopljene tvari (TDS) mjerene su u uzorcima u kiveti koji predstavljaju odvojeni supernatant nakon taloženja tekućih uzoraka mjerenih NIR spektroskopijom pomoću sonde. Korišten je konduktometar (S230 SevenCompact™) sa sondom za mjerenje vodljivosti. Sonda se uroni u uzorak te se očita vodljivost izražena u $\mu\text{S}/\text{cm}$ i TDS izražen u mg/L . Svaki uzorak mjeran je dva puta, a sonda je prije svakog mjerenja isprana deioniziranom vodom i obrisana čistim i suhim papirnatim ubrusom. Nakon mjerenja, isti uzorci mjerani su NIR spektroskopijom.

Za razliku od NIR spektroskopije, u ovom slučaju nisu mjerani uzorci supernatanta dobivenog taloženjem 10 grama oštrog i glatkog brašna, već je za usporedbu napravljen baždarni pravac za oštro i glatko brašno na način da je izmjerena vodljivost i TDS vodovodne vode te vodljivost i TDS supernatanta nakon taloženja u uzorcima od 25 mL vodovodne vode i 0.5g, 1g, 1.5g, 2g, 2.5g i 3g oštrog/glatkog brašna (ta količina odgovara postotcima od 5%, 10%, 15%, 20%, 25% i 30 % oštrog/glatkog brašna u uzorcima). Uzorci za izradu baždarnog pravca također su mjerani dva puta.

Za svaki uzorak izračunata je srednja vrijednost vodljivosti i TDS-a. Napravljeno je ukupno 8 grafova (po dva za svaku od 4 sirovine bez glutena gdje se jedan odnosi na vodljivost, a drugi na TDS). Na svakom grafu su 4 pravca: pravci za oštro i glatko brašno te pravci za sirovinu

bez glutena s kontaminantima npr. riža s oštrim i riža s glatkim brašnom. Kako bi svi pravci počeli od 0, kod vrijednosti za baždarni pravac oduzete su vrijednosti vodljivosti i TDS-a za vodu, a kod uzoraka sirovina bez glutena s kontaminantima, vrijednosti za sirovinu bez kontaminanta s vodom. Za svaki pravac izračunat je koeficijent determinacije (R^2) koji izražava jačinu linearne povezanosti. Vrijednosti R^2 kreću se od 0 do 1, a što je vrijednost bliža jedinici, veza je jača.

3.2.4. Svjetlosna mikroskopija

Metoda svjetlosne mikroskopije korištena je zbog utvrđivanja veličine i oblika čestica u osnovnim sirovinama korištenim za pripremu uzoraka (G, O, R, Rb, Kk, Kb) i u kombinacijama sirovina bez glutena sa sirovinama koje sadrže gluten (RG, RO, RbG, RbO, KkG, KkO, KbG, KbO). Korišten je Motic B1 Serija mikroskop s montiranom Moticom 3 mikroskopskom kamerom pomoću koje su uzorci fotografirani pri povećanju 4x.

Veličina i oblik čestica imaju utjecaj na brzinu taloženja. Veće čestice se talože brže od manjih i sferične čestice se talože brže od onih nepravilnijeg oblika (Mohammed, 2013). S obzirom na to da je taloženje svih uzoraka trajalo jedan sat, ova metoda bi mogla pomoći u objašnjenju rezultata koji se odnose na uzorke odvojenog supernatanta. Osim toga, NIR spektri osim kemijskih sadrže podatke i o fizičkim svojstvima analiziranih uzoraka pa podaci o kemijskim tvarima mogu biti zasjenjeni promjenama u spektrima uzrokovanim veličinom čestica uzoraka.

3.2.5. Obrada podataka

Svi eksperimentalni podaci dobiveni primjenom metode NIR spektroskopije, mjerenjem vodljivosti i ukupnih otopljenih tvari te određivanjem vlažnog i suhog glutena obrađeni su u programu MS Excel 2007.

Za svaki uzorak mjeren NIR spektroskopijom snimano je tri spektra iz kojih je izračunata srednja vrijednost koja se koristila za daljnju obradu podataka pomoću XLSTAT programa za MS Excel. Korištena je analiza glavnih komponenata (eng. Principal

Components Analysis, PCA) te linearna regresija pomoću koje su izrađeni modeli predikcije postotka dodanog brašna u praškastim uzorcima i tekućim uzorcima snimanim sondom gdje su kao zavisne varijable korišteni postotci dodanog brašna (0-30%), a kao nezavisne varijable korištene su odabrane valne duljine NIR spektra. Reprezentativnost modela ocjenjena je na temelju koeficijenta determinacije (R^2).

Analiza glavnih komponenata (PCA) je kemometrijska metoda koja se primjenjuje za dobivanje informacija iz kemijskih podataka pomoću statističkih postupaka. PCA omogućuje analizu i grupiranje podataka bez postavljenog fizičkog modela. Primjenjuje se za brzu procjenu strukture podataka prije kvantifikacije ili detaljne analize fizičkog ili kemijskog procesa. Dobiveni podaci mogu se prikazati točkama u n -dimenzijskom prostoru gdje svaka dimenzija predstavlja određenu varijablu x_i ($i = 1, 2, \dots, n$). Uvođenjem glavnih komponenata (eng. *principal components*, PC) smanjuje se dimenzionalnost prostora, što pojednostavljuje interpretaciju podataka. Prva glavna komponenta (PC1) opisuje najveću varijaciju u podacima, dok preostalu varijaciju opisuju ostale glavne komponente (PC2, PC3, ...). Glavne komponente su međusobno ortogonalne. Udaljenost t_i projekcije točke i na glavnu komponentu od ishodišta koordinatnog sustava naziva se *score* t_j vrijednost. Vizualizacija podataka se često izvodi pomoću tzv. faktorskih bodova (eng. *score plots*). Vrijednosti faktorskih bodova za spektre koji se razlikuju su odvojeni, dok se vrijednosti faktorskih bodova za slične spektre nalaze vrlo blizu, što omogućava njihovo grupiranje (Jednačak i Novak, 2013). U istraživanju je korištena varimax rotacija zbog dobivanja jednostavnije strukture koja omogućuje lakšu interpretaciju rezultata analize. Nakon varimax rotacije svaka glavna varijabla teži povezivanju s jednim ili malim brojem faktora i svaki faktor predstavlja mali broj varijabli (Abdi i Williams, 2010).

4. REZULTATI I RASPRAVA

Osnovni cilj istraživanja je primjena NIR spektroskopije u detekciji glutena, stoga su snimani NIR spektri uzoraka sirovina koje prirodno ne sadrže gluten (riža, rižino brašno, kukuruzno brašno i kukuruzna krupica) kontaminiranih različitim postotcima glatkog i oštrog brašna (5%, 10%, 15%, 20%, 25% i 30 %) i za usporedbu, NIR spektri zasebnih sirovina u svakoj kombinaciji. Snimane su tri vrste uzoraka: praškasti, praškasti s dodanom vodom (tekući uzorci snimani sondom) i uzorci supernatanta nakon taloženja prethodnih uzoraka (tekući uzorci snimani u kivetu). Za svaki uzorak snimljena su tri NIR spektra ovisnosti apsorbancije o valnim duljinama u rasponu od 904 nm do 1699 nm iz kojih je izračunata srednja vrijednost koja se koristila za daljnju analizu.

Međusobno je uspoređivano šest NIR spektara uzoraka iz svake kombinacije, za svaki tip uzoraka. To čini ukupno 24 grafa (8 kombinacija x 3 vrste uzoraka) s po 6 NIR spektara ovisnosti apsorbancije o valnoj duljini (ukupno 144 kontaminiranih uzoraka). Grafovi uglavnom nisu bili informativni jer je NIR spektar krivulja bez jasno izraženih pikova, a kako osim kemijskih informacija, sadrži i podatke o fizičkim karakteristikama uzoraka npr. veličini čestica, često su spektri uspoređivanih uzoraka bili vertikalno pomaknuti jedni od drugih tj. imali su veće ili manje apsorbancije duž cijelog spektra i zbog toga se nisu mogli uspoređivati pa su u rezultatima prikazani samo neki grafovi, a odnose se na praškaste i tekuće uzorke snimane sondom.

Svi rezultati dobiveni NIR spektroskopijom dodatno su obrađeni metodom analize glavnih komponenata (PCA) koja omogućuje grupiranje i analizu podataka bez postavljenog fizičkog modela. Analizirani uzorci grupiraju se prema sličnostima i razdvajaju prema različitostima. Dodatno je korištena varimax rotacija zbog dobivanja jednostavnije strukture koja omogućuje lakšu interpretaciju rezultata analize. Ukupno je napravljeno 25 analiza glavnih komponenata, jedna za osnovne sirovine i 8 analiza za svaki od tri tipa uzoraka gdje se po dvije odnose na jednu sirovinu bez glutena. U jednoj su kao ulazni podaci korišteni NIR spektri uzoraka, a u drugoj valne duljine pri kojima je dobivena najveća razlika u apsorbanciji između spektara zasebnih sirovina iz kombinacija. U rezultatima nisu prikazane analize koje se odnose na tekuće uzorke snimane u kivetu te je prikazano ukupno 17 analiza.

S ciljem predviđanja postotka dodanog pšeničnog brašna u uzorcima, izrađeni su linearni regresijski modeli za praškaste uzorke i tekuće uzorke snimane sondom. Kao zavisne varijable korišteni su postotci dodanog brašna, a kao nezavisne varijable korištene su

odabrane valne duljine NIR spektra. Prikazani su modeli čiji je koeficijent determinacije (R^2) veći od 0.9, odnosno ukupno 9 modela.

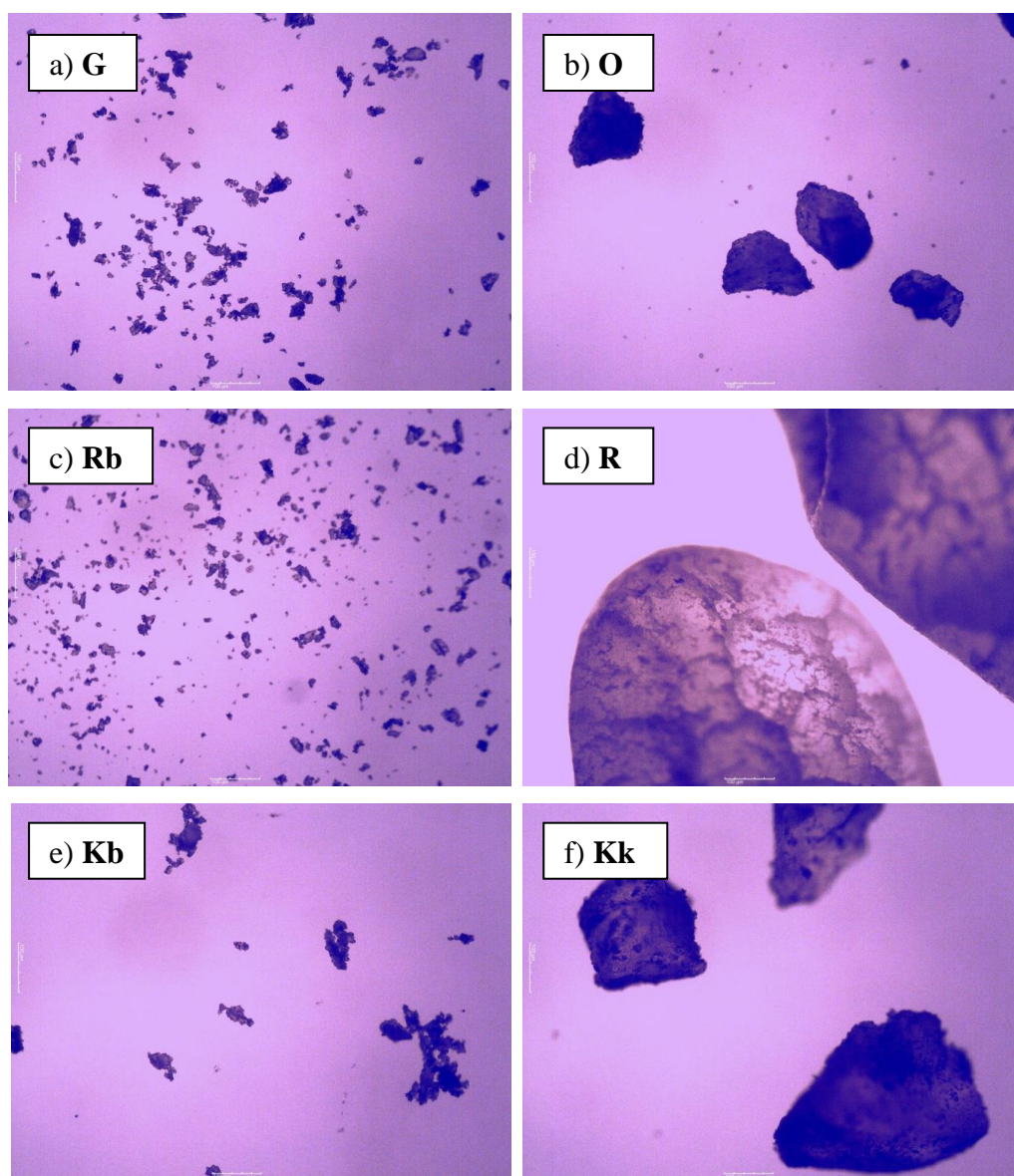
Veličina i oblik čestica u osnovnim sirovinama određeni su svjetlosnom mikroskopijom pri povećanju 4x. U rezultatima je prikazano 6 fotografija osnovnih sirovina i za usporedbu, 8 fotografija kombinacija snimljenih mikroskopskom kamerom.

Određivanje sadržaja vlažnog i suhog glutena u korištenim pšeničnim brašnima provedeno je metodom ručnog ispiranja škroba iz brašna do dobivanja vlažnog glutena koji je osušen zbog određivanja sadržaja suhog glutena. Iz dobivenog sadržaja glutena u brašnima izračunat je njihov sadržaj u kontaminiranim uzorcima. Dodatno je proces ispiranja praćen NIR spektroskopijom pri čemu je snimljeno po 10 spektara za određivanje vlažnog glutena u svakom brašnu. Rezultati su prikazani u dva zasebna grafa, a dodatno je za svih 20 spektara uzoraka provedena metoda analize glavnih komponenata.

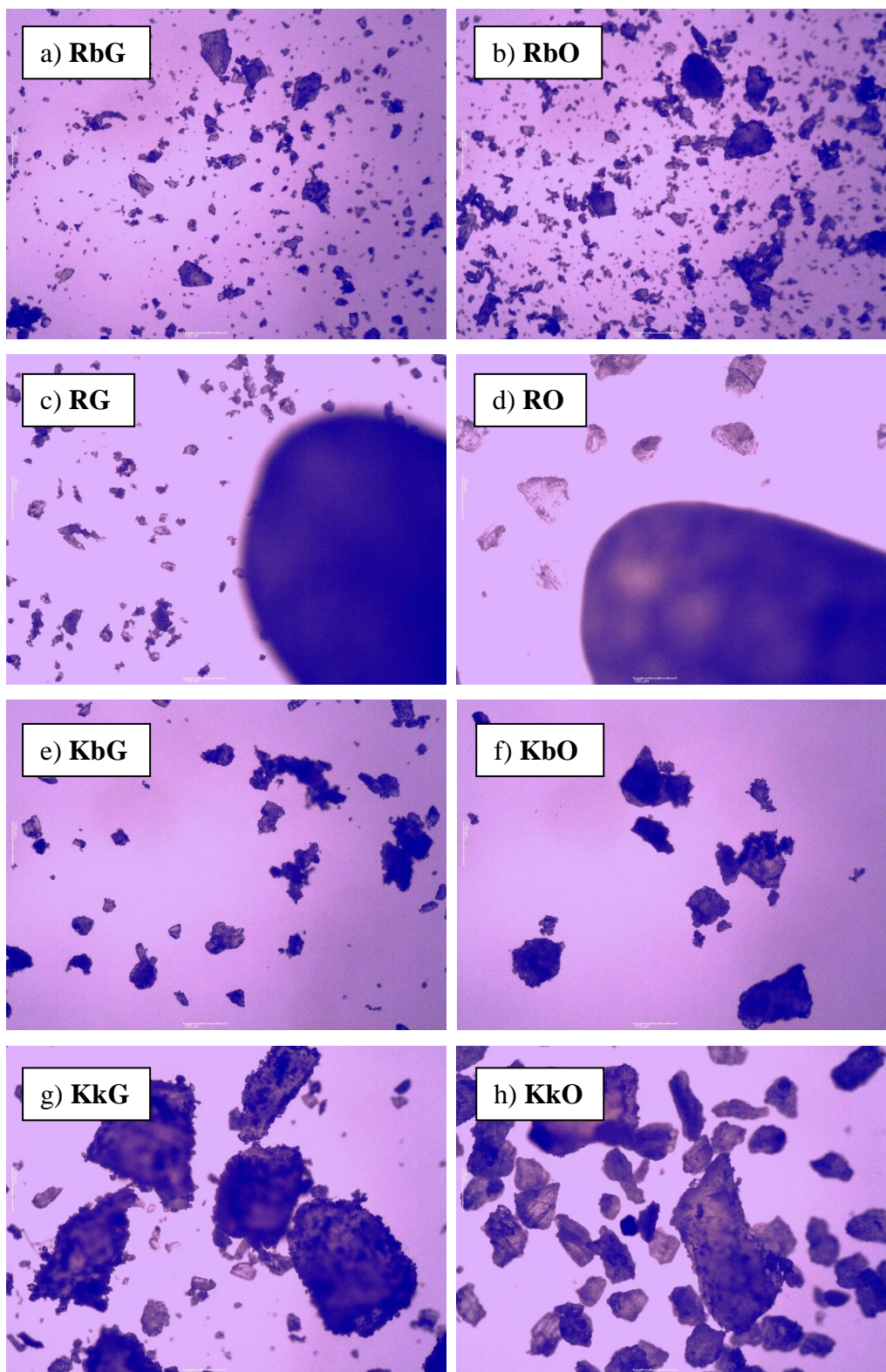
Prvo su prikazani rezultati svjetlosne mikroskopije i određivanja vlažnog i suhog glutena jer su korišteni pri objašnjenju rezultata NIR spektroskopije kontaminiranih uzoraka koji slijede nakon njih. Na kraju su prikazani rezultati dobiveni mjerenjem vodljivosti i ukupnih otopljenih tvari (TDS) u istim uzorcima koji su mjereni NIR spektroskopijom u kivetu. Rezultati mjerenja prikazani su na 8 grafova (po dva za svaku od 4 sirovine bez glutena gdje se jedan odnosi na vodljivost, a drugi na TDS. Na svakom grafu su 4 pravca: baždarni pravci za oštro i glatko brašno te pravci za kontaminiranu sirovinu npr. riža s oštrim i riža s glatkim brašnom. Za sve pravce izračunati su koeficijenti determinacije (R^2) pomoću kojih su objašnjeni dobiveni rezultati.

4.1. SVJETLOSNA MIKROSKOPIJA

U nastavku su prikazane fotografije snimljene na mikroskopu pri povećanju 4x, a odnose se na korištene osnovne sirovine: pšenično glatko (G) i oštro brašno (O), rižino brašno (Rb), riža (R), kukuruzno brašno (Kb) i kukuruzna krupica (Kk) (slika 5, a - f). Zbog usporedbe, prikazane su i fotografije kombinacija sirovina bez glutena kontaminiranih glatkim i ostrim brašnom: RbG, RbO, RG, RO, KbG, KbO, KkG i KkO (slika 6, a - h).



Slika 5. Mikroskopske fotografije osnovnih sirovina korištenih u istraživanju: a) glatko pšenično brašno, b) oštro pšenično brašno, c) rižino brašno, d) riža, e) kukuruzno brašno i f) kukuruzna krupica, pri povećanju 4x



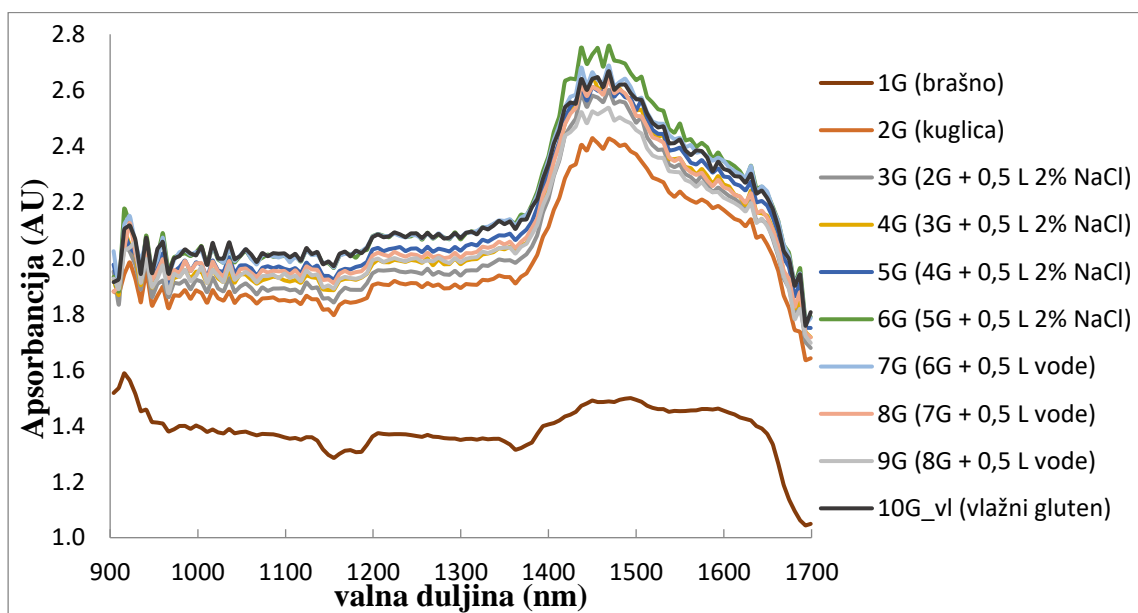
Slika 6. Mikroskopske fotografije sirovina bez glutena kontaminiranih glatkim i ostrim pšeničnim brašnom: a) rižino i glatko brašno, b) rižino i oštro brašno, c) riža i glatko brašno, d) riža i oštro brašno, e) kukuruzno i glatko brašno i f) kukuruzno i oštro brašno, g) kukuruzna krupica i glatko brašno i h) kukuruzna krupica i oštro brašno, pri povećanju 4x

Na slikama je vidljivo da su sve čestice nepravilnog oblika. Kukuruzna krupica (u usporedbi s brašnima) ima najveće čestice (oko 450 μm ili manje). Slijedi oštro brašno s veličinom oko 180 μm ili manje. Ostala brašna (glatko, rižino i kukuruzno) pokazuju veliki raspon veličina čestica koji ne prelazi 100 μm . Kod navedenih brašna uočeno je stvaranje nakupina čestica što je najviše izraženo kod kukuruznog brašna.

4.2. ODREĐIVANJE VLAŽNOG I SUHOG GLUTENA

4.2.1. NIR spektroskopija određivanja vlažnog glutena

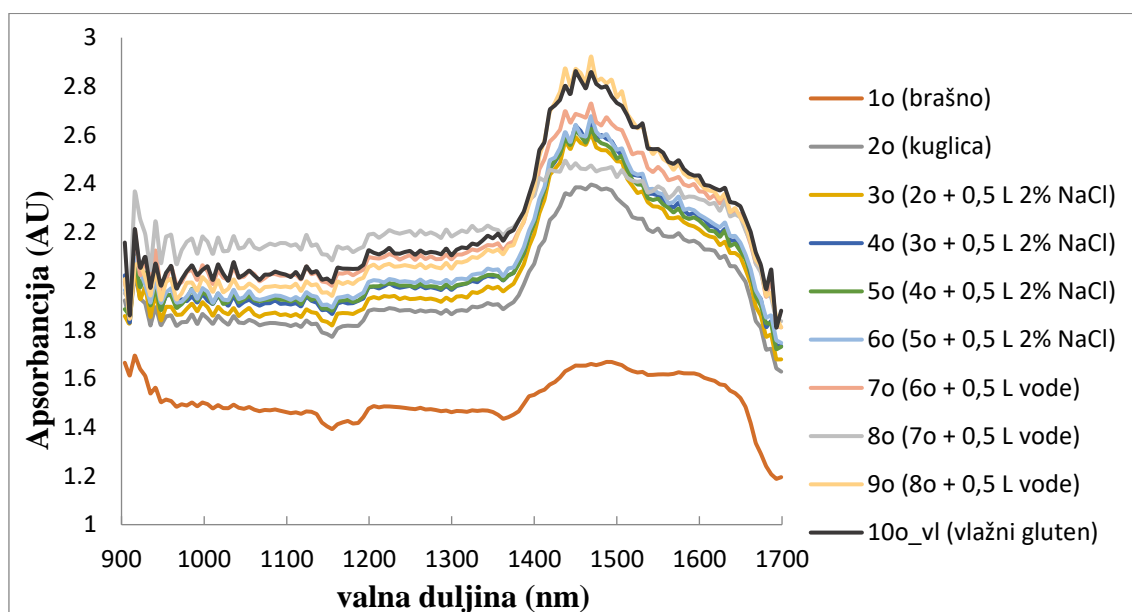
Kod određivanja vlažnog glutena u oštroj i glatkoj pšeničnoj brašni pojedini uzorci nastali u procesu mjereni su NIR spektroskopijom. Tijekom ispiranja, gluten veže vodu i tvori glutensku mrežu, a kraj ispiranja označava potpuni nestanak škroba iz uzorka. Prvo je mjeran uzorak brašna pa 4 uzorka dobivena ispiranjem 2% otopinom NaCl, zatim 3 uzorka ispirana vodom iz slavine i na kraju ispiranja uzorak vlažnog glutena. U nastavku se nalaze slike koje se odnose na određivanje vlažnog glutena glatkog (slika 7) i oštrog pšeničnog brašna (Slika 8), a sadrže NIR spektre ovisnosti apsorbancije o valnim duljinama u rasponu od 904 nm do 1699 nm.



Slika 7. NIR spektri uzoraka nastalih u procesu određivanja vlažnog glutena u glatkom pšeničnom brašnu

Na slici 7. jasno se vidi razlika između NIR spektra glatkog brašna i ostalih uzoraka koji pokazuju veće apsorbancije duž cijelog spektra. Osim toga, karakterizira ih jači signal u rasponu valnih duljina od oko 1400 nm do 1550 nm zbog sadržaja vode. U tom rasponu pojavljuje se i prvi overton N-H veze karakteristične za proteine (Badr Eldin, 2011). Uzorku brašna najbliži je uzorak 2G koji mu je ujedno i najsličniji, a najveću apsorbanciju oko 1450 nm pokazuje uzorak 6G, moguće zbog nevezane vode koja nije istisnuta prije snimanja.

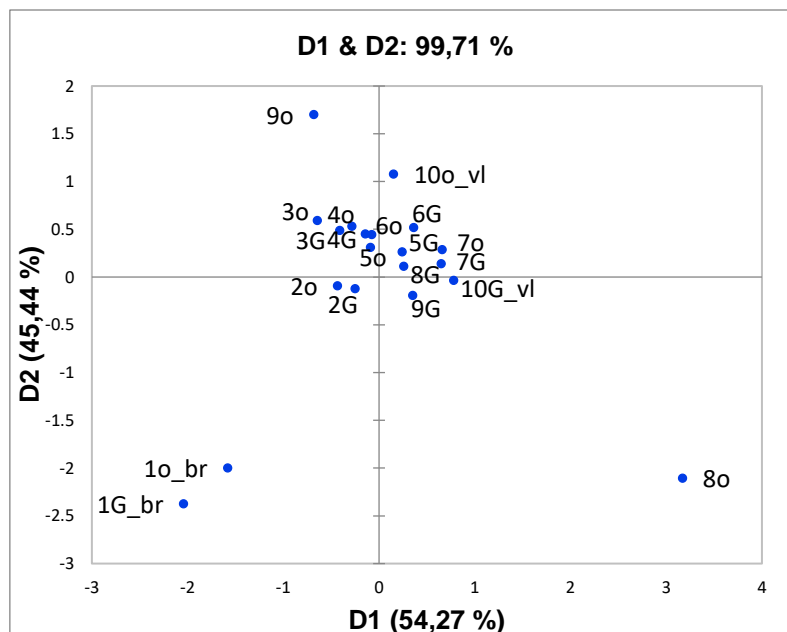
Slika 8. s prikazom određivanja vlažnog glutena u oštrom brašnu slijedi u nastavku, a može se opisati isto kao i prethodna, osim razlike u najvećoj apsorbanciji koju u ovom slučaju pokazuje uzorak 9o i uzorak vlažnog glutena snimljen nakon njega. Također je vidljivo odstupanje spektra uzorka 8o od ostalih ispiranih uzoraka.



Slika 8. NIR spektri uzoraka nastalih u procesu određivanja vlažnog glutena u oštrom pšeničnom brašnu

4.2.1.2. Analiza glavnih komponenata

Analiza glavnih komponenata NIR spektara uzoraka nastalih u procesu određivanja vlažnog glutena u glatkom i oštrom brašnu prikazana je na slici 9.



Slika 9. PCA analiza NIR spektara uzoraka nastalih u procesu određivanja vlažnog glutena u glatkom i oštroj brašnu

Na slici 9. vidljivo je da glavne komponente (D1 i D2) objašnjavaju ukupno 99,71% varijance u promatranom skupu podataka. Također su vidljive dvije glavne grupacije, uz značajno izdvajanje uzorka 8o i manje izdvajanje uzorka 9o. Jednu grupaciju čine brašna koja su se odvojila u treći kvadrant, a drugu čine ostali uzorci pri čemu su se uzorci 2o i 2G smjestili u treći kvadrant što je logično s obzirom da predstavljaju kuglicu brašna koja još nije ispirana. Također, uzorci nastali u prvom dijelu ispiranja nalaze se s lijeve strane, dok su s desne strane uzorci iz drugog dijela ispiranja koji se približavaju zadnjim uzorcima (vlažni gluten - 10o_vl i 10G_vl).

4.2.2. Količina vlažnog i suhog glutena u oštroj i glatkom pšeničnom brašnu

U postupku iz prethodnog poglavlja određen je sadržaj vlažnog glutena od 23,34% u glatkom i 20,93% u oštroj brašnu. Budući da ti uzorci nisu osušeni, zbog utvrđivanja sadržaja suhog glutena u brašnu postupak je ponovljen pri čemu je određen sadržaj vlažnog glutena od 22,93% u glatkom i 19,78% u oštroj brašnu. U prvom postupku određena je veća količina vlažnog glutena nego u drugom. Metoda je provedena ručnim ispiranjem pa postoji mogućnost da je došlo do gubitaka prilikom ispiranja ili da je u vlažnim glutenima u prvom postupku ostao dio škroba. Ipak, Ionescu i sur. (2010) navode kako nema statistički značajne

razlike između metode ručnog ispiranja i drugih metoda određivanja vlažnog glutena te da se sadržaj vlažnog glutena u pšeničnim brašnima kreće 23 do 31%. Kim i sur. (2017) navode raspon od 22,4 do 39,8% te da sadržaj vlažnog glutena u pšeničnom brašnu značajno ovisi o sorti pšenice od koje je brašno napravljeno i o regiji u kojoj se pšenica uzgaja.

Sušenjem vlažnog glutena dobivenog u drugom postupku određen je sadržaj suhog glutena od 7,92% u glatkom i 7,25% u oštroj brašnu. Prema istraživanju Marti i sur. (2015) koji su ispitivali sadržaj glutena u 19 uzoraka bijelih brašna različitih sorti pšenice sadržaj glutena kreće se od 8,93 do 13,44%.

Iz količine vlažnog i suhog glutena dobivene drugim postupkom, izračunati su postotci vlažnog i suhog glutena u uzorcima kontaminiranim s 0.5g, 1g, 1.5g, 2g, 2.5g i 3 g oštrog i glatkog brašna (Tablica 5).

Tablica 5. Postotak vlažnog i suhog glutena u kontaminiranim uzorcima

KONTAMINIRANI UZORCI				
Masa dodanog brašna (g)	Dodano GLATKO brašno		Dodano OŠTRO brašno	
	Vlažni gluten (%)	Suhi gluten (%)	Vlažni gluten (%)	Suhi gluten (%)
0,5	1,09	0,38	0,94	0,35
1	2,09	0,72	1,80	0,66
1,5	2,99	1,03	2,58	0,95
2	3,82	1,32	3,30	1,21
2,5	4,59	1,59	3,96	1,45
3	5,29	1,83	4,57	1,67

4.3. NIR SPEKTROSKOPIJA UZORAKA KONTAMINIRANIH GLUTENOM

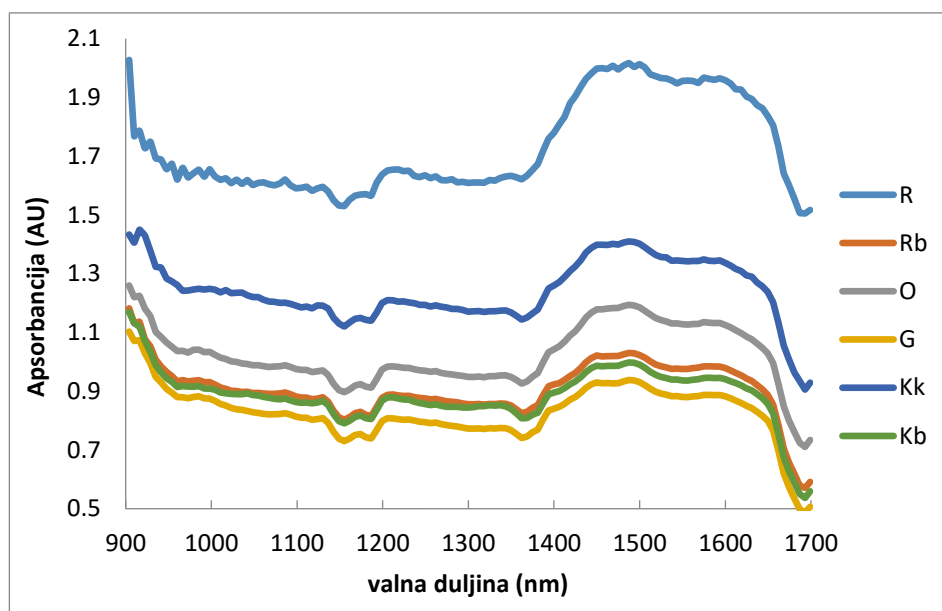
U literaturi su vrlo rijetka istraživanja o primjeni NIR spektroskopije u detekciji glutena. Slično istraživanje o detekciji glutena u kontaminiranim bezglutenskim brašnima i tijestu, proveli su Albanell i sur. (2012), međutim, u tom istraživanju NIR spektri su snimani u području valnih duljina od 1100 nm do 2500 nm, a apsorpcijske vrpce karakteristične za gluten pronađene su u rasponu od 2000 nm do 2350 nm. To potvrđuju i Wesley i sur. (2002)

te Wimonsiri i sur. (2017) koji navode kako se povećanjem koncentracije glutena u uzorcima povećava apsorbancija pri valnoj duljini 2175 nm.

U istraživanju su snimani spektri u nižem području valnih duljina (904-1699 nm) u kojemu su apsorpcijske vrpce slabije izražene te je veće njihovo preklapanje. Uz to, NIR spektar osim kemijskih informacija, sadrži i podatke o fizičkim karakteristikama uzoraka npr. veličini čestica i gustoći. Različita veličina čestica u uzorcima utječe na pomake i razdvajanje spektara uzoraka pri čemu uzorci s većim česticama pokazuju veće apsorbancije (Metrohm, 2013). To potvrđuju i Chen i sur. (2008) za razdvajanje spektara rižinih brašna s različitim veličinama čestica.

Zbog navedenih razloga, snimljeni NIR spektri bili su slabo informativni, a u rezultatima su kao primjer navedeni samo neki koji se odnose na praškaste i tekuće uzorke snimane sondom.

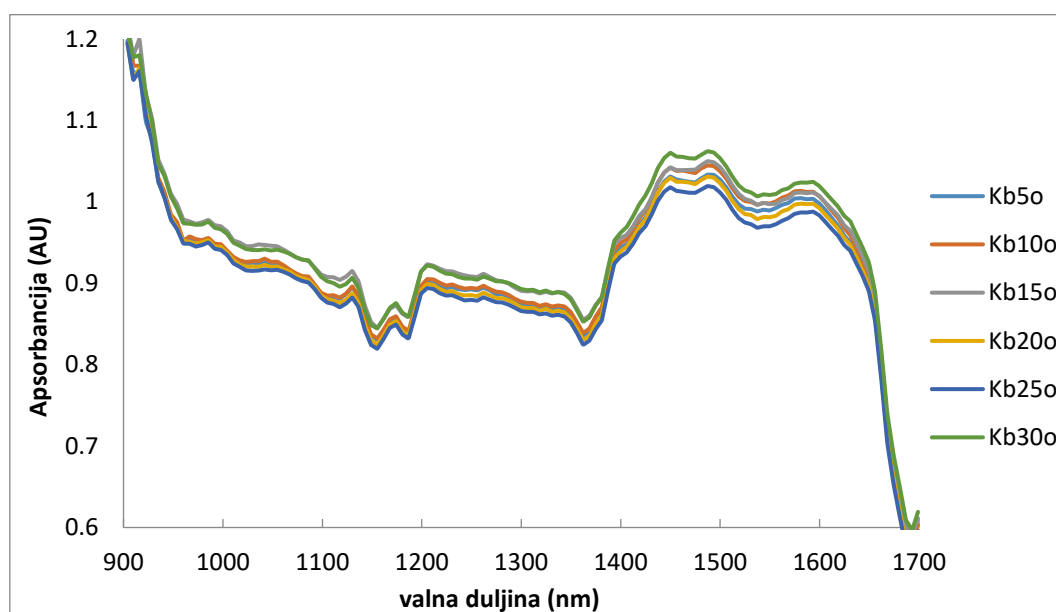
Slika 10. prikazuje NIR spektre osnovnih sirovina korištenih u istraživanju gdje se vidi da riža pokazuje najveće apsorbancije te slijede spektri kukuruzne krupice i oštrog brašna. Položaj spektara navedenih sirovina u skladu je s određenim veličinama čestica. Spektri ostale tri sirovine s česticama manjim od 100 μm , blizu su jedni drugih, dok se spektar glatkog brašna odvađa od spektra kukuruznog i rižinog brašna.



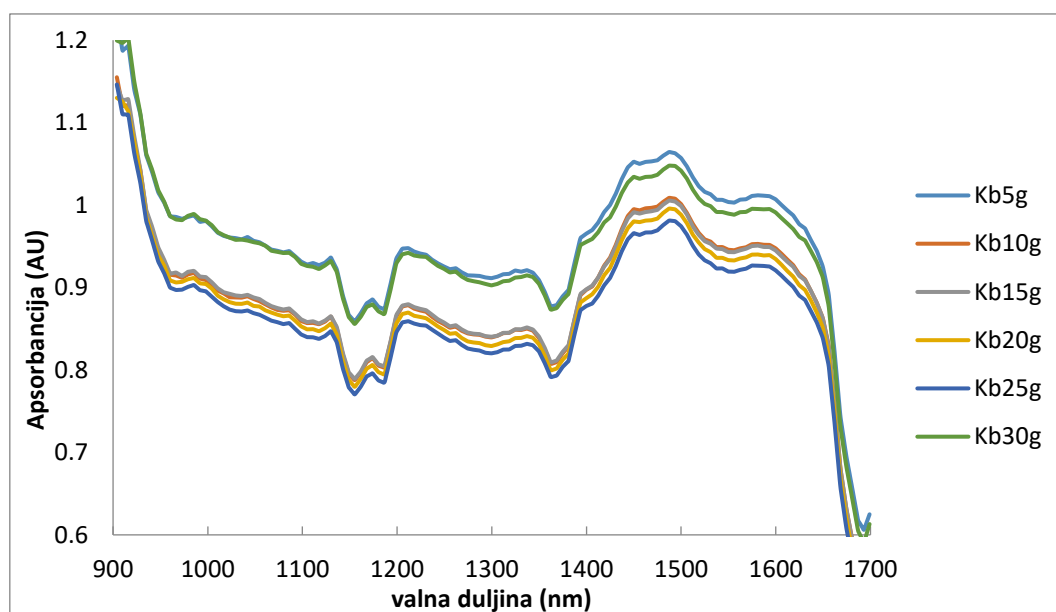
Slika 10. NIR spektri osnovnih sirovina korištenih u istraživanju

U nastavku su prikazani NIR spektri praškastih uzoraka kukuruznog brašna kontaminiranog oštrim (Slika 11) i glatkim brašnom (Slika 12), rižinog brašna

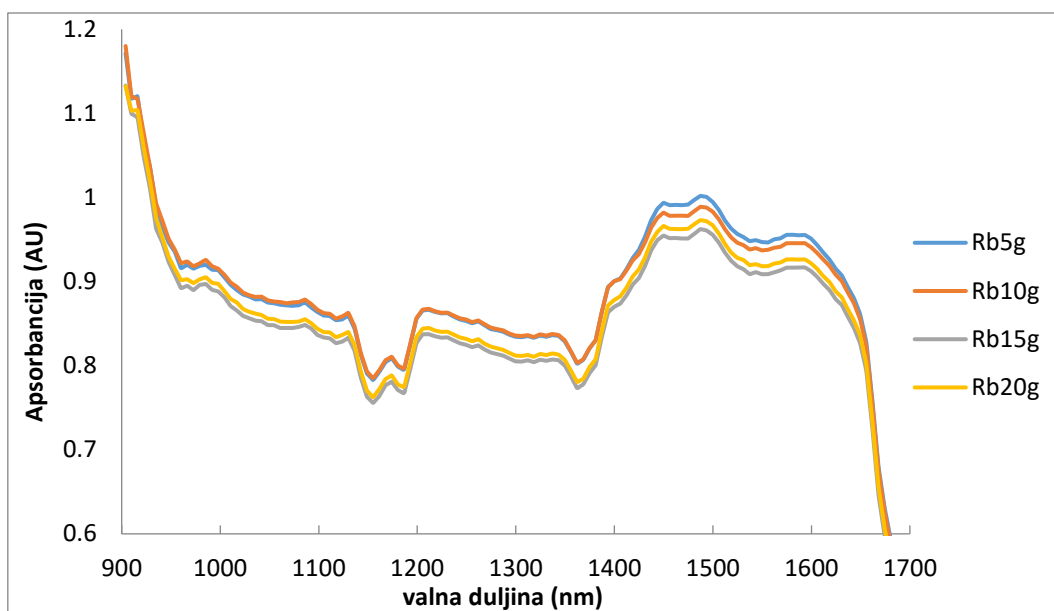
kontaminiranog glatkim brašnom (Slika 13) i kukuruzne krupice kontaminirane oštrim brašnom (Slika 14).



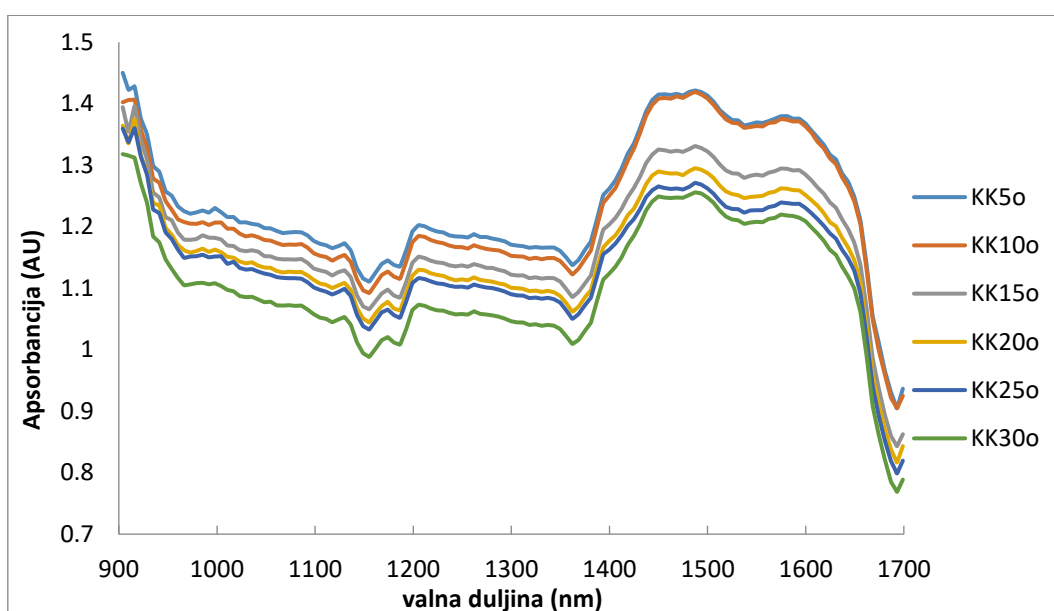
Slika 11. NIR spektri praškastih uzoraka kukuruznog brašna kontaminiranog različitim postotcima oštrog brašna (5-30%)



Slika 12. NIR spektri praškastih uzoraka kukuruznog brašna kontaminiranog različitim postotkom glatkog brašna (5-20%)



Slika 13. NIR spektri praškastih uzoraka rižinog brašna kontaminiranog različitim postotcima glatkog brašna (5-20%)

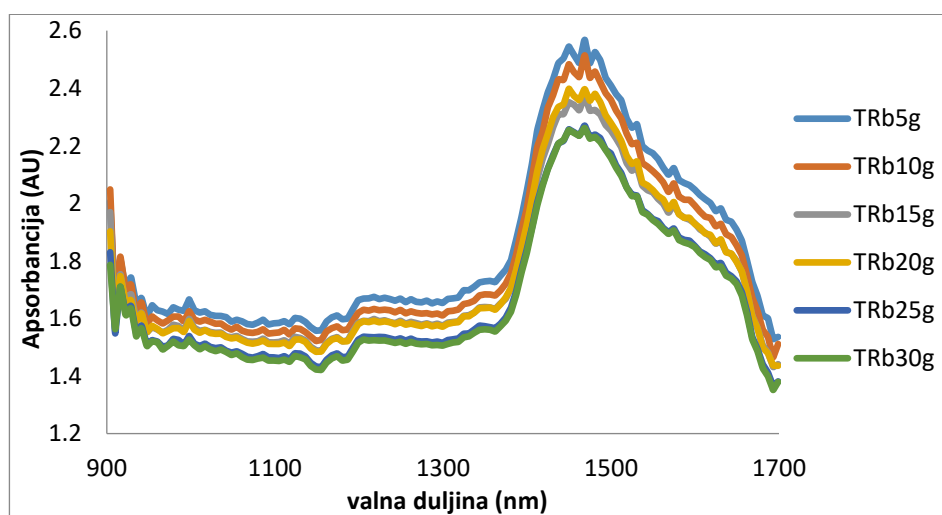


Slika 14. NIR spektri praškastih uzoraka kukuruzne krupice kontaminirane različitim postotcima oštrog brašna (5-30%)

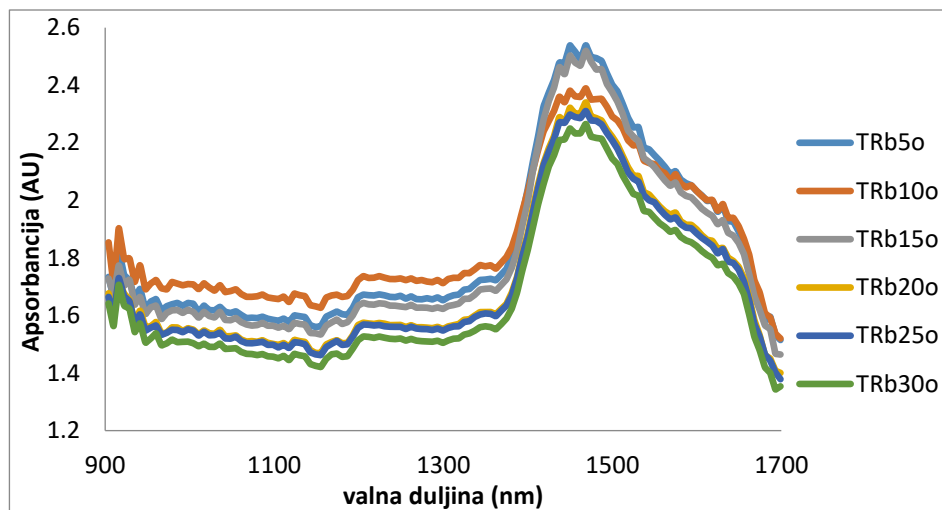
Od praškastih uzoraka, najslićniji su NIR spektri uzoraka kukuruznog brašna kontaminiranog različitim postotcima oštrog brašna (5-30%) (slika 11) gdje se među svim uzorcima vidi razlika u području valnih duljina od 1450-1600 nm u kojoj se pojavljuje prvi overton O-H i N-H veze koja je karakteristična za proteine (Metrohm, 2013; Badr Eldin, 2011). Međutim, pojavljuju se i razlike u spektrima od oko 950 nm do oko 1350 nm, najviše između uzoraka s

30% i 15% brašna u odnosu na ostale. Najjače su izražene razlike od 950 nm do 1100 nm gdje se javlja drugi overton O-H i N-H veze i u području iznad 1200 do 1350 gdje se pojavljuje drugi overton C-H veze (Badr Eldin, 2011). Slično je prisutno kod uzoraka kukuruznog brašna kontaminiranog različitim postotcima glatkog brašna (slika 12), ali su se uzorci međusobno više odvojili, u tom slučaju najviše uzorci s 5% i 30% glatkog brašna koji međusobno pokazuju najveće razlike, iznad 1450 nm do 1600 nm. Razlike u tom području vidljive su i kod međusobno sličnih uzoraka (Rižinog brašna s 5% i 10% te rižinog brašna s 15% i 20% glatkog brašna) što je prikazano na slici 13. gdje su radi lakše vizualizacije, spektri uzoraka s 25% i 30% brašna izostavljeni. To nije slučaj kod uzoraka kukuruzne krupice kontaminirane ostrim brašnom gdje uzorci s 5% i 10% brašna pokazuju razlike samo do 1350 nm. Kod svih uzoraka je vidljivo i najveće razdvajanje te smanjenje apsorbancije povećanjem postotka dodanog brašna (Slika 14).

U usporedbi s NIR spektrima praškastih uzoraka, spektri tekućih uzoraka snimanih sondom općenito su pokazivali više apsorbancije u području od oko 1450 nm do 1550 nm zbog višeg sadržaja vode. U nastavku su prikazani spektri uzoraka rižinog brašna kontaminiranog glatkim brašnom (5-30%) (slika 15) i ostrim brašnom (5-30%) (slika 16). Kod uzoraka kontaminiranih ostrim brašnom vidi se veće razdvajanje spektara, a na obje slike spektri uzoraka s većim udjelom brašna pokazuju manje apsorbancije i obrnuto.



Slika 15. NIR spektri tekućih uzoraka (snimanih sondom) rižinog brašna kontaminiranog različitim postotcima glatkog brašna (5-30%)



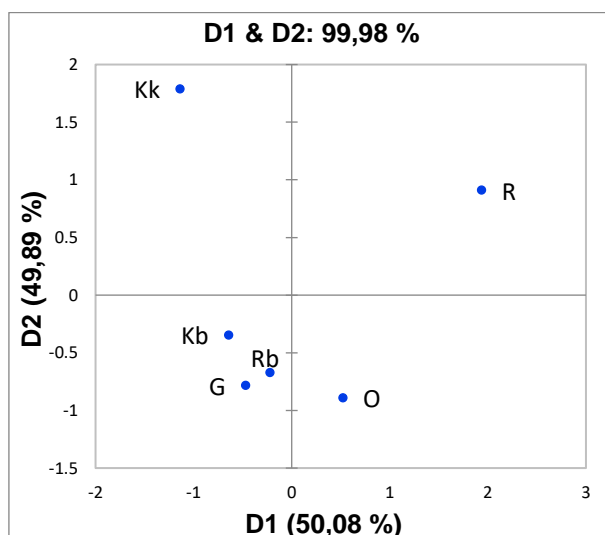
Slika 16. NIR spektri tekućih uzoraka rižinog brašna kontaminiranog različitim postotcima oštrog brašna (5-30%)

NIR spektri praškastih i tekućih uzoraka (snimanih sondom) koji se odnose na kontaminaciju riže nisu prikazani jer su se međusobno najviše razlikovali. Spektri tekućih uzoraka snimanih u kiveti pokazivali su najviše apsorbancije duž cijelog spektra. Nadalje, kod nekih uzoraka spektar je pokazivao veliki broj šumova u području od 1400 nm do 1600 nm koji su najjače bili izraženi kod uzoraka kukuruznog brašna, a smanjivali su se produljenjem vremena taloženja.

4.3.1. Analiza glavnih komponenata

Svi rezultati dobiveni NIR spektroskopijom obrađeni su metodom analize glavnih komponenata (PCA). PCA analiza NIR spektara osnovnih sirovina prikazana je na slici 17., a ostalih 16 analiza podijeljeno je na podpoglavlja ovisno o tipu uzoraka (praškasti i tekući snimani sondom). Iako je napravljeno ukupno 24 analiza koje se odnose na kontaminirane uzorke, analize tekućih uzoraka snimanih u kiveti nisu prikazane zbog velikog broja rezultata i njihovog manjeg značaja u istraživanju o primjeni NIR spektroskopije u detekciji glutena. Svaka analiza sadrži uzorke dvije kombinacije jedne kontaminirane sirovine (npr. riža+oštro brašno od 5-30% i riža+glatko brašno od 5-30%) i zasebne uzorke iz kombinacija (npr. riža, oštro brašno i glatko brašno). Kod svakog tipa uzoraka ukupno je 8 analiza, a po dvije se odnose na jednu sirovinu bez glutena. U jednoj su kao ulazni podaci korišteni NIR spektri uzoraka, a u drugoj apsorbancije uzoraka pri valnim duljinama kod kojih je prisutna najveća

razlika apsorbancije između spektra sirovine bez glutena i spektra pšeničnih brašna (npr. valne duljine dobivene oduzimanjem spektra riže i oštrog te riže i glatkog brašna). Kod tekućih uzoraka snimanih sondom, za usporedbu su u analizu dodani spektri uzoraka vlažnog glutena, a dodatno su korištene valne duljine dobivene iz najveće razlike između spektra sirovine bez glutena i vlažnog glutena (npr. riže i vlažnog glutena iz glatkog brašna te riže i vlažnog glutena iz oštrog brašna). Popis korištenih valnih duljina prikazan je u tablici 6.



Slika 17. PCA analiza NIR spektara osnovnih sirovina korištenih u istraživanju

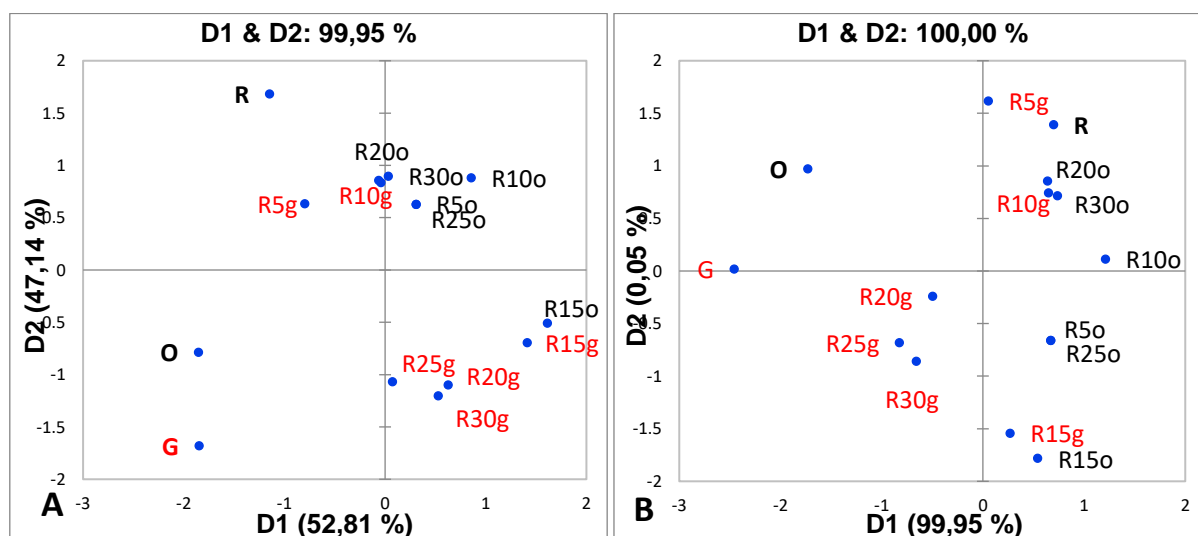
Na slici 17. vidljivo je da su se sve osnovne sirovine razdvojile, a njihova raspodjela može se objasniti prema različitoj veličini čestica. Riža, kukuruzna krupica i oštro brašno razdvojili su se u zasebne kvadrante, dok su kukuruzno, rižino i glatko brašno zajedno u trećem kvadrantu.

Tablica 6. Popis valnih duljina korištenih u PCA analizama različitih vrsta uzoraka kontaminiranih osnovnih sirovina

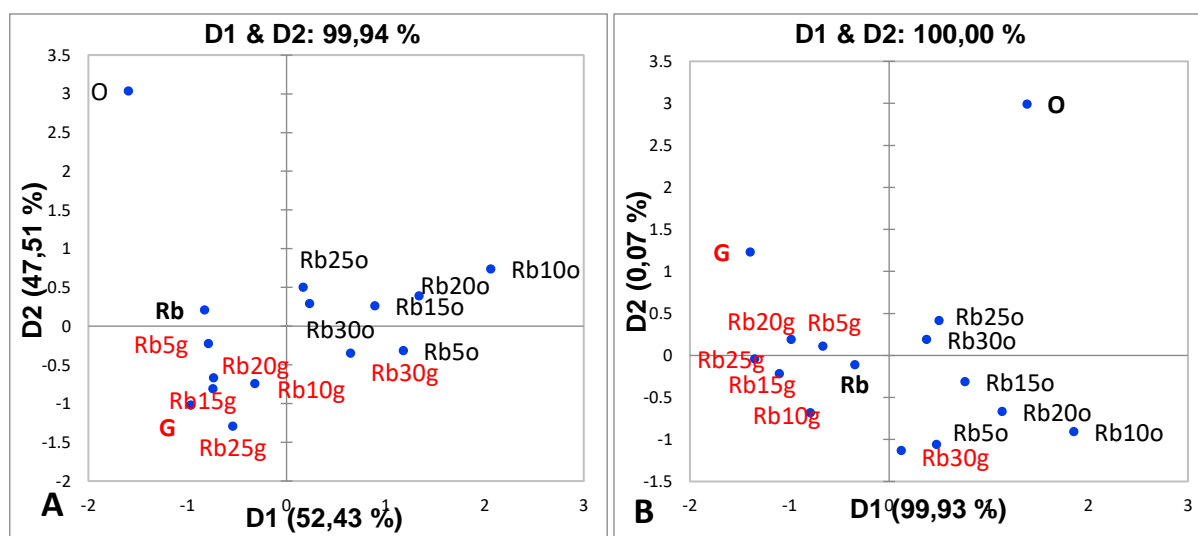
PRAŠKASTI UZORCI		TEKUĆI UZORCI (sonda)		TEKUĆI UZORCI (kiveta)	
R	1500, 1599	TR	1469, 1437	kiR	1544, 1649
Rb	1481, 1587	TRb	904, 1437	kiRb	1544, 1649
Kk	1469, 922	TKk*	1469, 1437, 1622, 1369	kiKk	1556, 928
Kb	1475, 1325	TKb	1437, 1462	kiKb	1469, 1470

* Prema broju oduzimanja, kod tekućih uzoraka snimanih sondom trebalo bi biti četiri valne duljine, no to je slučaj jedino kod kukuruzne krupice jer su kod drugih sirovina pojedine razlike bile iste.

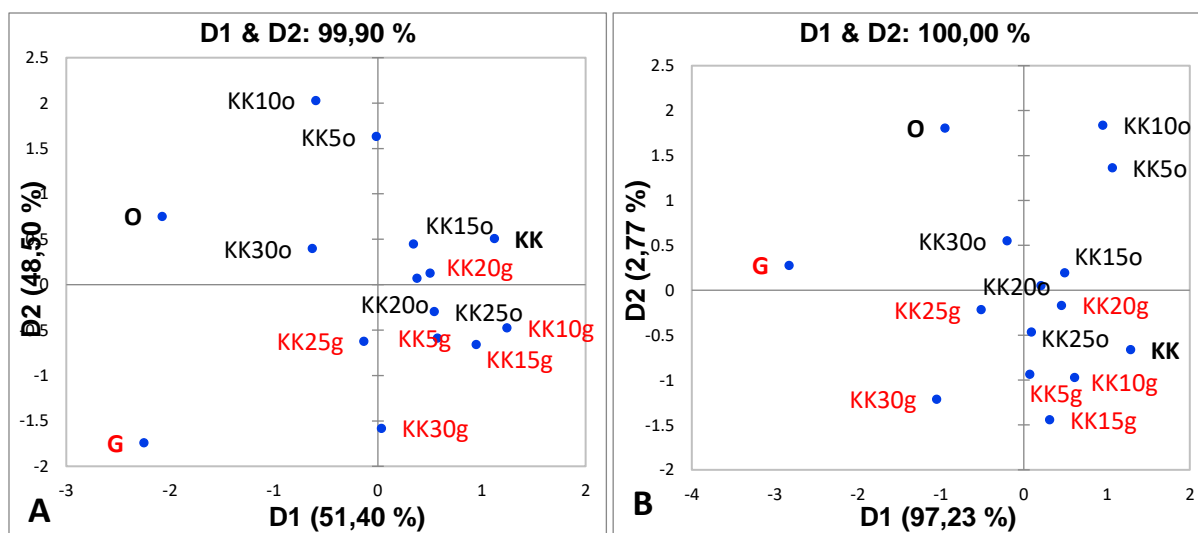
4.3.1.1. PCA analiza praškastih uzoraka



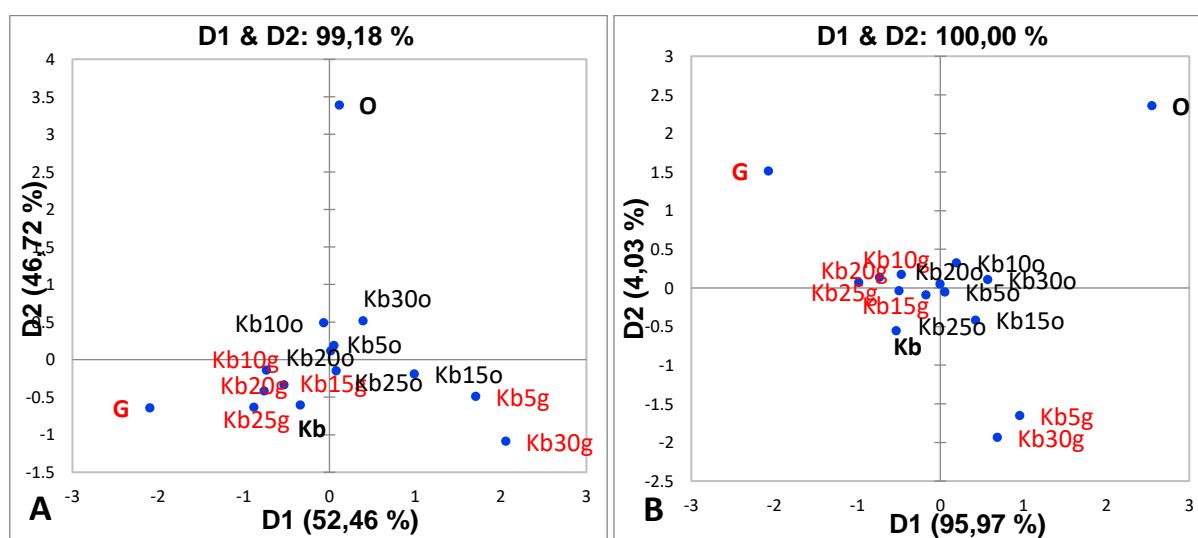
Slika 18. PCA analize praškastih uzoraka riže kontaminirane različitim postotcima oštrog i glatkog brašna te pripadajućih uzoraka zasebnih sirovina. A) NIR spektri; B) 1500 nm i 1599 nm



Slika 19. PCA analize praškastih uzoraka rižinog brašna kontaminiranog različitim postotcima oštrog i glatkog brašna te pripadajućih uzoraka zasebnih sirovina. A) NIR spektri; B) 1481 nm i 1587 nm



Slika 20. PCA analize praškastih uzoraka kukuruzne krupice kontaminirane različitim postotcima oštrog i glatkog brašna te pripadajućih uzoraka zasebnih sirovina. A) NIR spektri; B) 1469 nm i 922 nm

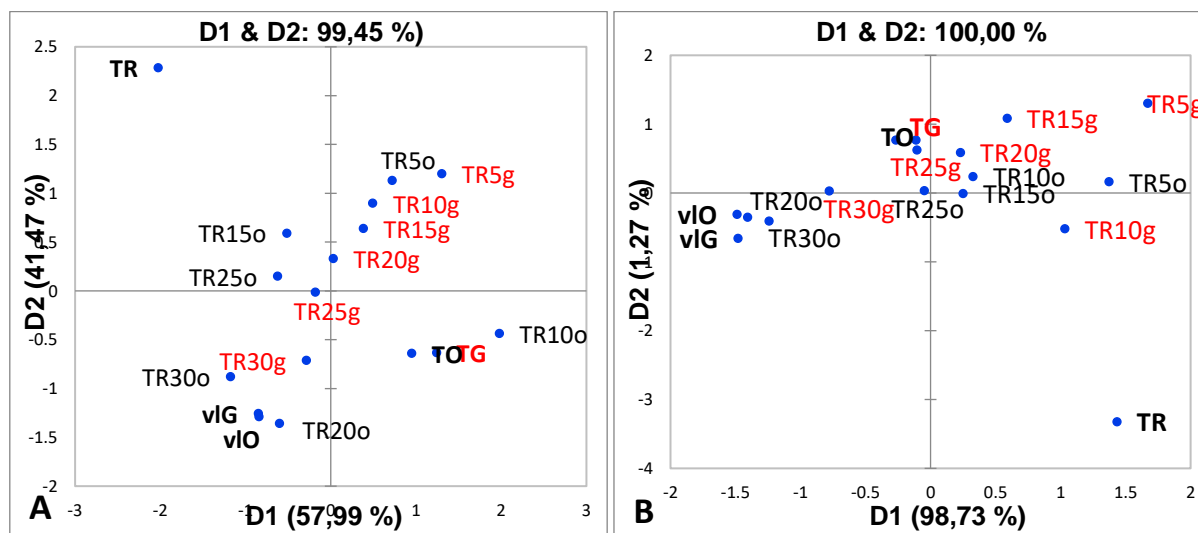


Slika 21. PCA analize praškastih uzoraka kukuruznog brašna kontaminiranog različitim postotcima oštrog i glatkog brašna te pripadajućih uzoraka zasebnih sirovina. A) NIR spektri; B) 1475 nm i 1325 nm

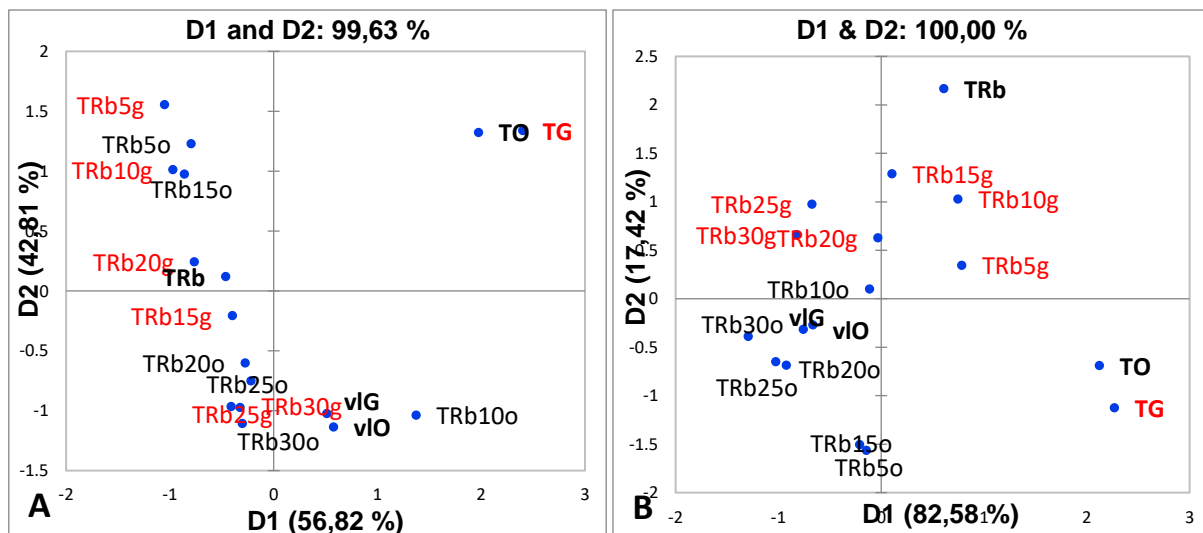
Kod svih PCA analiza praškastih uzoraka glavne komponente (D1 i D2) zajedno objašnjavaju više od 99% varijance u promatranom skupu podataka, međutim, nakon korištenja podataka koji se odnose na odabrane valne duljine (na slikama 18-21, B) većinu objašnjava prva komponenta (D1).

Kod analiza koje se odnose na rižu (slika 18) logičniju raspodjelu pokazuju uzorci kontaminirani glatkim brašnom. Nakon korištenja valnih duljina 1500 nm i 1599 nm (slika 18, B) bolje je razdvajanje uzoraka kontaminiranih ostrim brašnom, a uzorci riže s 5% i 10% glatkog brašna smjestili su se u kvadrant zajedno s rižom, uzorak s 15% glatkog brašna u četvrti kvadrant i uzorci s 20-30% glatkog brašna u treći kvadrant gdje je i uzorak glatkog brašna. Analize koje se odnose na rižino brašno (slika 19) ne pokazuju značajne razlike, jedino je uzorak rižinog brašna nakon korištenja valnih duljina 1481 nm i 1587 nm (Slika 19, B) u zasebnom kvadrantu u odnosu na pšenična brašna. Uzorci rižinog brašna kontaminirani glatkim i ostrim brašnom čine dvije grupacije, a ako se uzme u obzir B analiza, uzorci kontaminirani glatkim brašnom nalaze se s lijeve strane gdje je glatko brašno, a uzorci kontaminirani ostrim brašnom s desne strane gdje je oštro brašno. Analize uzoraka kukuruzne krupice (slika 20) u oba slučaja (A i B) pokazuju da su uzorci kontaminirani glatkim brašnom bliže glatkom, a uzorci kontaminirani ostrim bliže oštro brašnu te je u analizi B (1469 nm i 922 nm) kukuruzna krupica udaljenija od pšeničnih brašna. Kod kukuruznog brašna (slika 21) vidljivo je izdvajanje uzoraka s 5% i 30% glatkog brašna, a u analizi B (1475 nm i 1325 nm) još je izraženija grupacija kontaminiranih uzoraka, međutim, opet je vidljiva raspodjela na lijevu i desnu stranu s obzirom na vrstu brašna kojim su uzorci kontaminirani.

4.3.1.2. PCA analiza tekućih uzoraka snimanih sondom

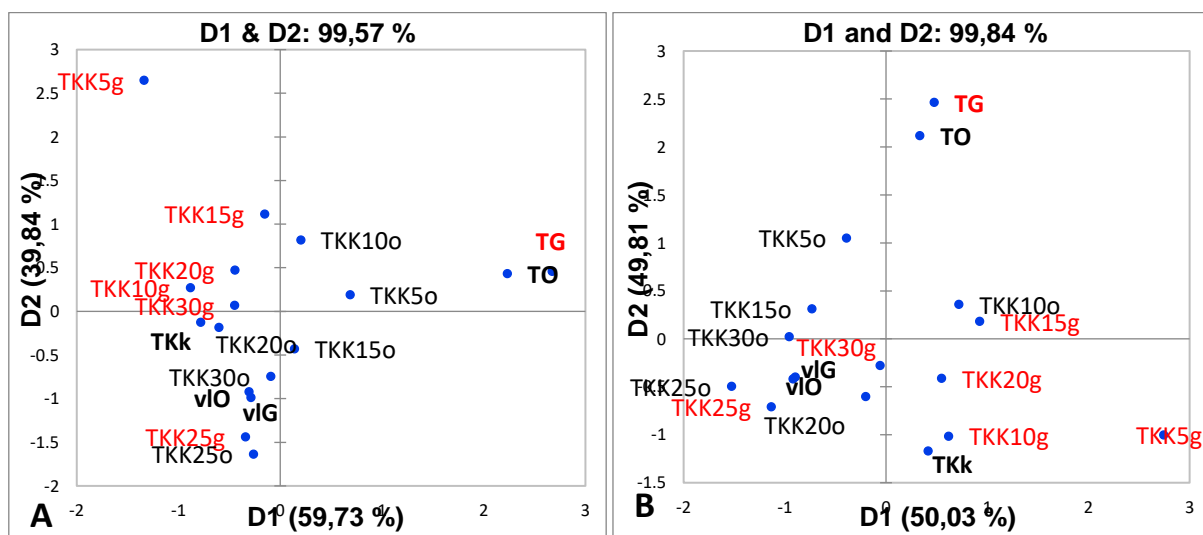


Slika 22. PCA analize tekućih uzoraka riže kontaminirane različitim postotcima ostrog i glatkog brašna, pripadajućih uzoraka zasebnih sirovina te uzoraka vlažnog glutena. A) NIR spektri; B) 1469 nm i 1437 nm (snimanje sondom)

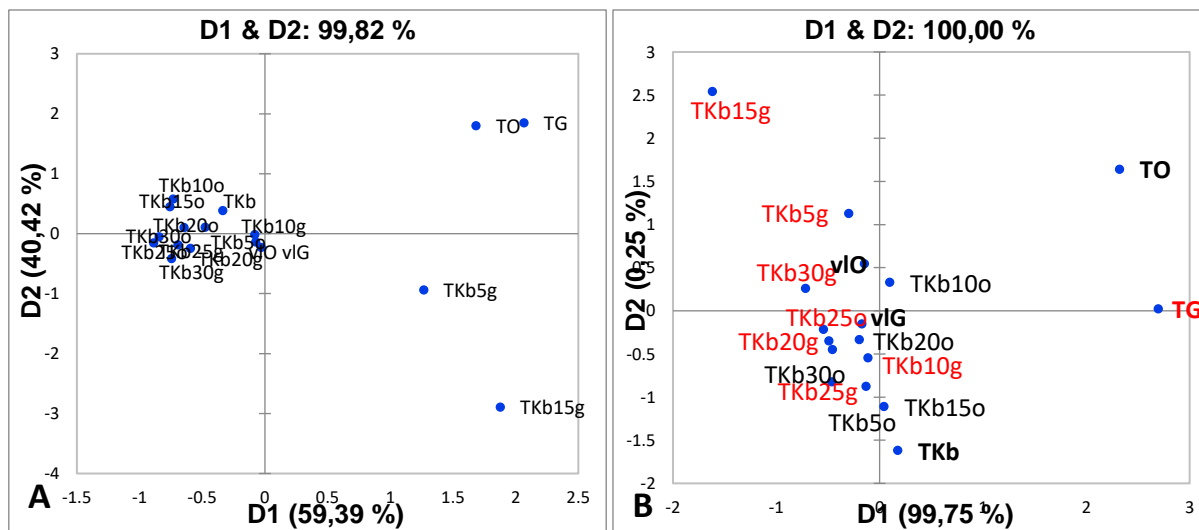


Slika 23. PCA analize tekućih uzoraka rižinog brašna kontaminiranog različitim postotcima oštrog i glatkog brašna, pripadajućih uzoraka zasebnih sirovina te uzoraka vlažnog glutena.

A) NIR spektri; B) 904 nm i 1437 nm (snimanje sandom)



Slika 24. PCA analize tekućih uzoraka kukuruzne krupice kontaminirane različitim postotcima oštrog i glatkog brašna, pripadajućih uzoraka zasebnih sirovina te uzoraka vlažnog glutena. A) NIR spektri; B) 1469 nm, 1437 nm, 1622 nm i 1369 nm (snimanje sandom)



Slika 25. PCA analize tekućih uzoraka kukuruznog brašna kontaminiranog različitim postotcima oštrog i glatkog brašna, pripadajućih uzoraka zasebnih sirovina te uzoraka vlažnog glutena. A) NIR spektri; B) 1437 nm i 1462 nm (snimanje sondom)

Kao i kod praškastih uzoraka, u PCA analizama tekućih uzoraka snimanih sondom, glavne komponente (D1 i D2) zajedno objašnjavaju više od 99% varijance u promatranom skupu podataka, a nakon korištenja podataka koji se odnose na odabrane valne duljine, kod analiza uzoraka riže i kukuruznog brašna (slike 22 i 25, B) većinu objašnjava prva komponenta (D1). Nadalje, u svim analizama koje se odnose na ovaj tip uzoraka (slike 22-25), vidljivo je grupiranje uzoraka s većim postotkom dodanog brašna oko uzoraka vlažnog glutena te je uočeno manje razdvajanje tekućih uzoraka pšeničnih brašna nego kod analiza praškastih uzoraka (slike 18-21).

Kod analiza tekućih uzoraka riže (slika 22) vidljivo je veće grupiranje uzoraka nakon korištenja podataka koji se odnose na valne duljine 1469 nm i 1437 nm (slika 22, B). U navedenoj analizi svi kontaminirani uzorci čine jednu grupaciju koja se kreće od prvog kvadranta gdje su uzorci s manje dodanog brašna, prema trećem kvadrantu u kojem su uzorci vlažnog glutena i uzorci s više dodanog brašna. Kod obje analize (slika 22) tekući uzorak riže nalazi se u suprotnom kvadrantu u odnosu na tekuće uzorke glatkog i oštrog brašna. Kod analiza tekućih uzoraka rižinog brašna (slika 23), analiza koja se odnosi na valne duljine 904 nm i 1437 nm (slika 23; B) pokazuje bolje razdvajanje uzoraka, veće razdvajanje uzoraka s obzirom na brašno kojim su kontaminirani i veće grupiranje kontaminiranih uzoraka oko uzoraka vlažnog glutena. Analiza NIR spektara (slika 23, A) pokazuje, kao i kod riže, grupaciju kontaminiranih uzoraka koji se porastom koncentracije dodanog brašna približavaju

uzorcima vlažnog glutena. Analiza tekućih uzoraka kukuruzne krupice pri korištenju podataka valnih duljina 1469 nm, 1437 nm, 1622nm i 1369 nm (slika 24, B) pokazuje bolje razdvajanje uzoraka i odvajanje uzorka kukuruzne krupice od uzoraka vlažnog glutena. U analizi NIR spektara tekućih uzoraka kukuruznog brašna (slika 25, A) većina uzoraka grupirala se u uskom području te ih je zbog toga teško razlikovati. Korištenjem podataka valnih duljina 1437 nm i 1462 nm, uzorci su se bolje razdvojili, a većina kontaminiranih uzoraka grupirana je oko uzoraka vlažnog glutena (slika 25, B).

4.3.2. Linearni regresijski modeli

S ciljem predviđanja postotka dodanog pšeničnog brašna u uzorcima, izrađeni su linearni regresijski modeli gdje su kao zavisne varijable korišteni postotci dodanog brašna (0%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25% i 30%), a kao nezavisne varijable korištene su odabrane valne duljine NIR spektra (960 nm, 1200 nm, 1437 nm i 1469 nm).

Navedeni postotci brašna dodanog u uzorke predstavljaju sadržaj vlažnog glutena od 0% do 5,29% za glatko brašno te od 0% do 4,57% za oštro brašno odnosno sadržaj suhog glutena od 0% do 1,83% za glatko brašno te od 0% do 1,67% za oštro brašno (tablica 5). Albanell i sur. (2012) izradili su kalibracijske modele u sličnom rasponu vlažnih glutena (od 0% do 4,6%), međutim, NIR spektri su u tom slučaju snimani u rasponu valnih duljina od 1100 nm do 2500 nm. Nadalje, navode kako NIR spektroskopija može točno predvidjeti koncentraciju glutena u brašnu i tijestu, ali se ne bi trebala smatrati pouzdanom metodom za utvrđivanje kontaminacije u bezglutenskim proizvodima u kojima bi sadržaj glutena trebao biti manji od 20 mgkg⁻¹ jer su ustanovili da se efikasnost kalibracije smanjuje kod koncentracije glutena manje od 0,09%.

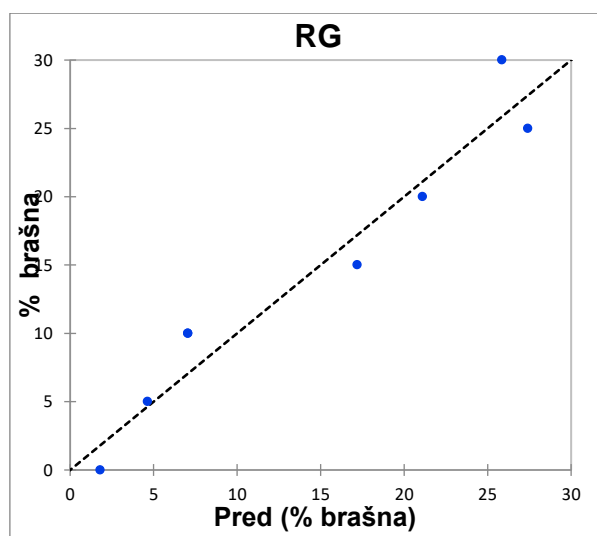
Valne duljine 1437 nm i 1469 nm najčešće su se pojavljivale kod računanja najvećih razlika NIR spektara kod tekućih uzoraka snimanih sandom. Te valne duljine su u rasponu gdje se pojavljuje prvi overton O-H i N-H veze karakteristične za proteine. Nadalje, Albanell i sur. (2012) u svom istraživanju o primjeni NIR spektroskopije u detekciji glutena u bezglutenskim brašnima, navode valne duljine 1436 nm i 1202 nm kod kojih je vidljiv porast apsorbancije druge derivacije NIR spektra. Wesley i sur. (2002) također navode slične valne duljine, 1430 nm koja je karakteristična za proteine i vodu te 1200 nm gdje se pojavljuje drugi overton C-H veze i navode da se u tom području mogu pratiti interakcije između škroba, vode

i proteina. Valna duljina 960 nm nalazi se u rasponu gdje se pojavljuje drugi overton O-H i N-H veze (Metrohm, 2013).

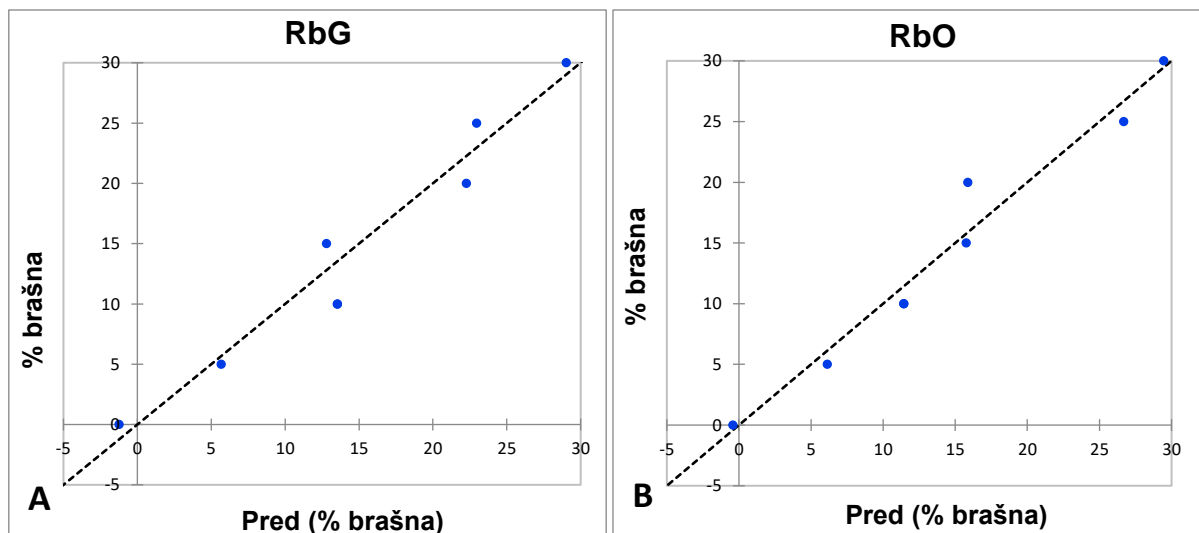
Reprezentativnost modela ocjenjuje se koeficijentom determinacije (R^2), a što je njegova vrijednost veća (bliža jedinici) model je reprezentativniji. Za primjenjivi model, koeficijent determinacije trebao bi biti veći od 0,9 (Gajdoš Kljusurić i sur., 2016; Gajdoš Kljusurić i sur., 2017). U istraživanju je 5 modela za praškaste uzorke i 4 modela za tekuće uzorke snimane sondom, uz interval pouzdanosti od 95%, pokazalo koeficijent determinacije veći od 0,9 te su oni prikazani u nastavku po podpoglavljima ovisno o tipu uzoraka.

4.3.2.1. Linearni regresijski modeli praškastih uzoraka

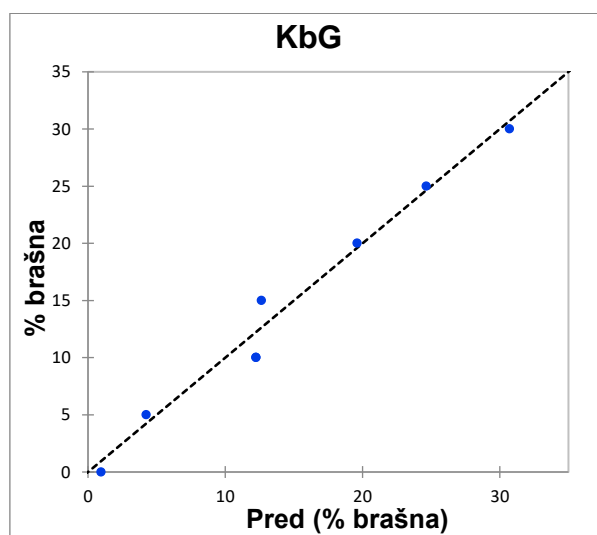
U nastavku su prikazani linearni regresijski modeli praškastih uzoraka s koeficijentom determinacije većim od 0,9: riža kontaminirana glatkim brašnom (slika 26), rižino brašno kontaminirano glatkim i ostrim brašnom (slika 27, A i B), kukuruzno brašno kontaminirano glatkim (slika 28) i kukuruzna krupica kontaminirana ostrim brašnom (slika 29).



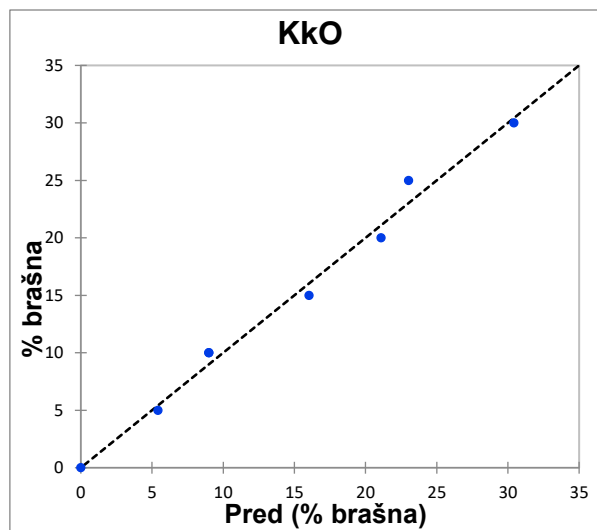
Slika 26. Linearni regresijski model predviđanja postotka dodanog glatkog brašna u uzorcima riže, $R^2 = 0,941$



Slika 27. Linearni regresijski modeli predviđanja postotka dodanog pšeničnog brašna u uzorcima rižinog brašna. **A)** glatko, $R^2 = 0,958$; **B)** oštro, $R^2 = 0,965$



Slika 28. Linearni regresijski model predviđanja postotka dodanog glatkog brašna u uzorcima kukuruznog brašna, $R^2 = 0,982$

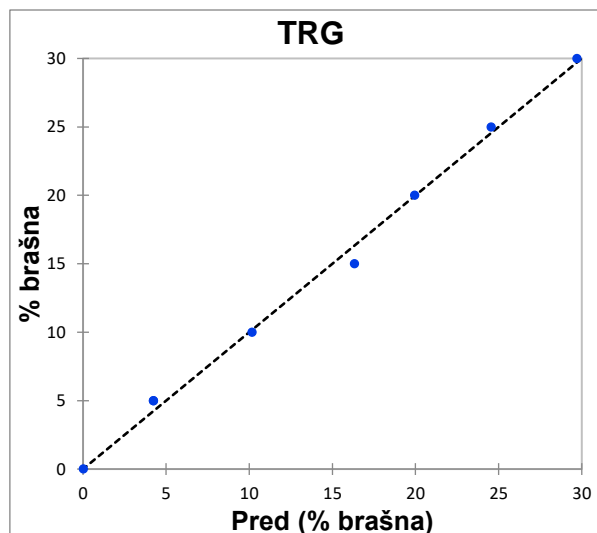


Slika 29. Linearni regresijski model predviđanja postotka dodanog oštrog brašna u uzorcima kukuruzne krupice, $R^2 = 0,989$

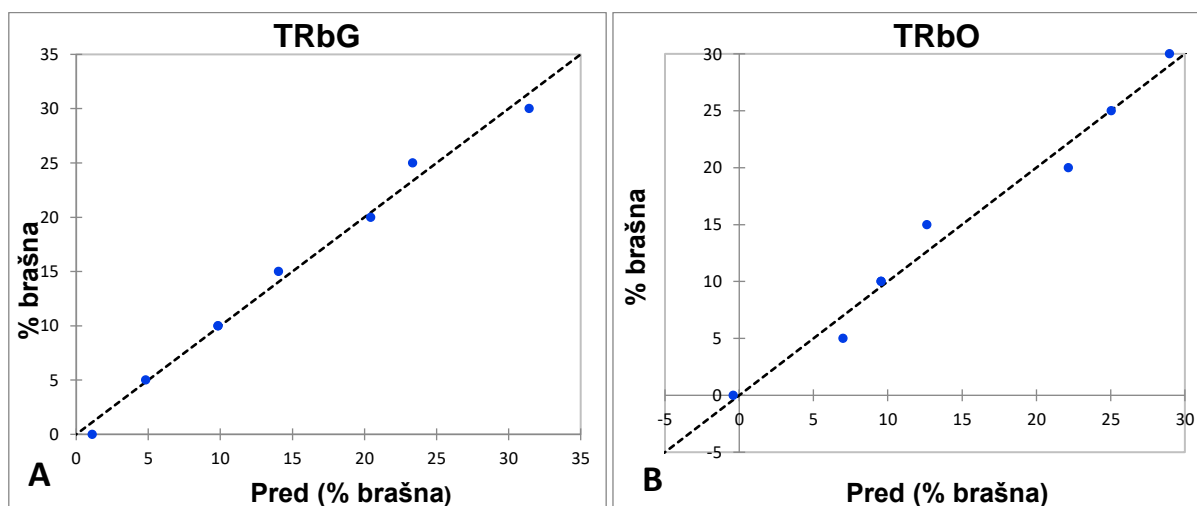
Najveći koeficijent determinacije pokazuje model za predviđanje postotka dodanog oštrog brašna u kukuruznoj krupici ($R^2 = 0,989$) (slika 29). Uzorci s kukuruzom kao osnovom pokazuju veće koeficijente determinacije (slika 28 i 29) od uzoraka s rižinom osnovom (slika 26 i 27), ali je jedino kod rižinog brašna razvijen primjenjivi model za oba pšenična brašna (slika 27, A i B).

4.3.2.2. Linearni regresijski modeli tekućih uzoraka snimanih sondom

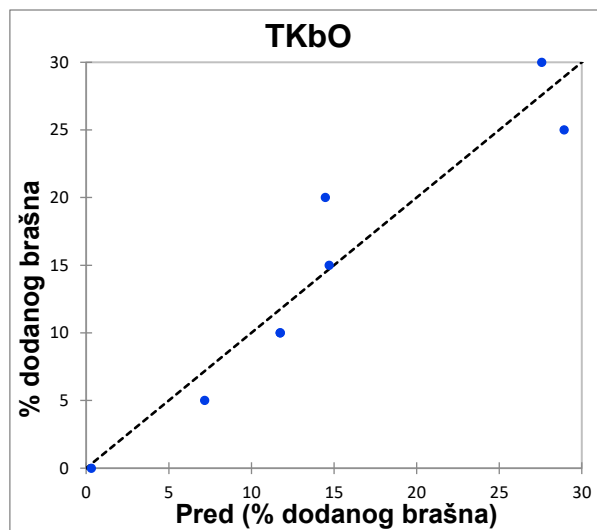
U nastavku su prikazani linearni regresijski modeli tekućih uzoraka snimanih sondom s koeficijentom determinacije većim od 0,9. Kao i kod praškastih uzoraka, razvijeni su modeli za tekuće uzorke: riže kontaminirane glatkim brašnom (slika 30) i rižinog brašna kontaminiranog glatkim i ostrim brašnom (slika 31, A i B), a kod kukuruznog brašna razvijen je model za drugo pšenično brašno (oštro) (slika 32).



Slika 30. Linearni regresijski model predviđanja postotka dodanog glatkog brašna u tekućim uzorcima riže, $R^2 = 0,996$



Slika 31. Linearni regresijski modeli predviđanja postotka dodanog pšeničnog brašna u tekućim uzorcima rižinog brašna. **A)** glatko, $R^2 = 0,990$; **B)** oštro, $R^2 = 0,978$

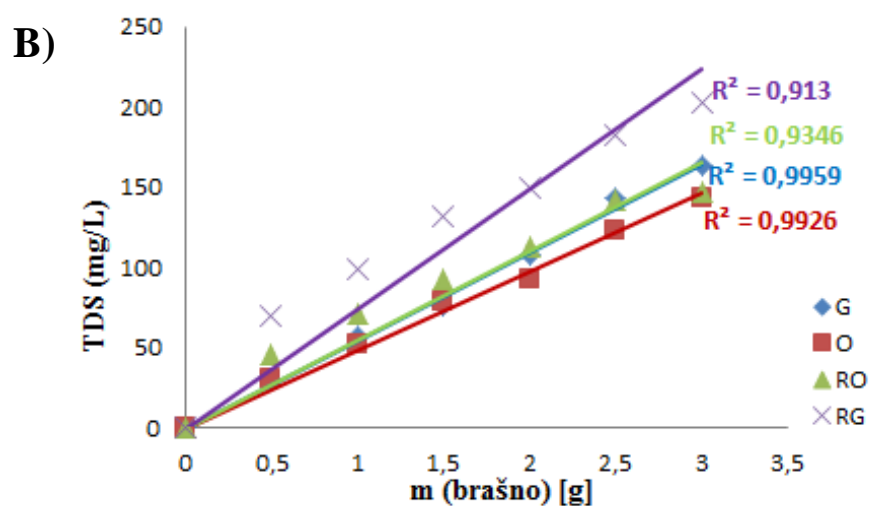
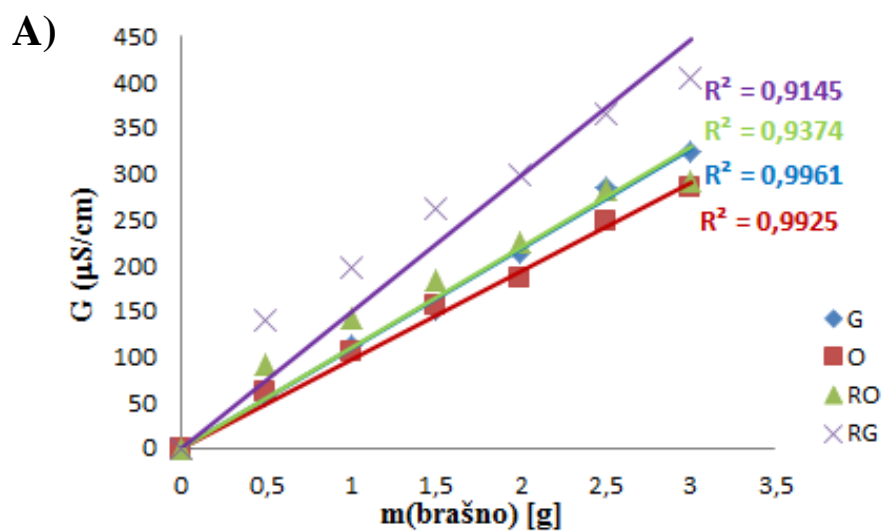


Slika 32. Linearni regresijski model predviđanja postotka dodanog oštrog brašna u tekućim uzorcima kukuruznog brašna, $R^2 = 0,914$

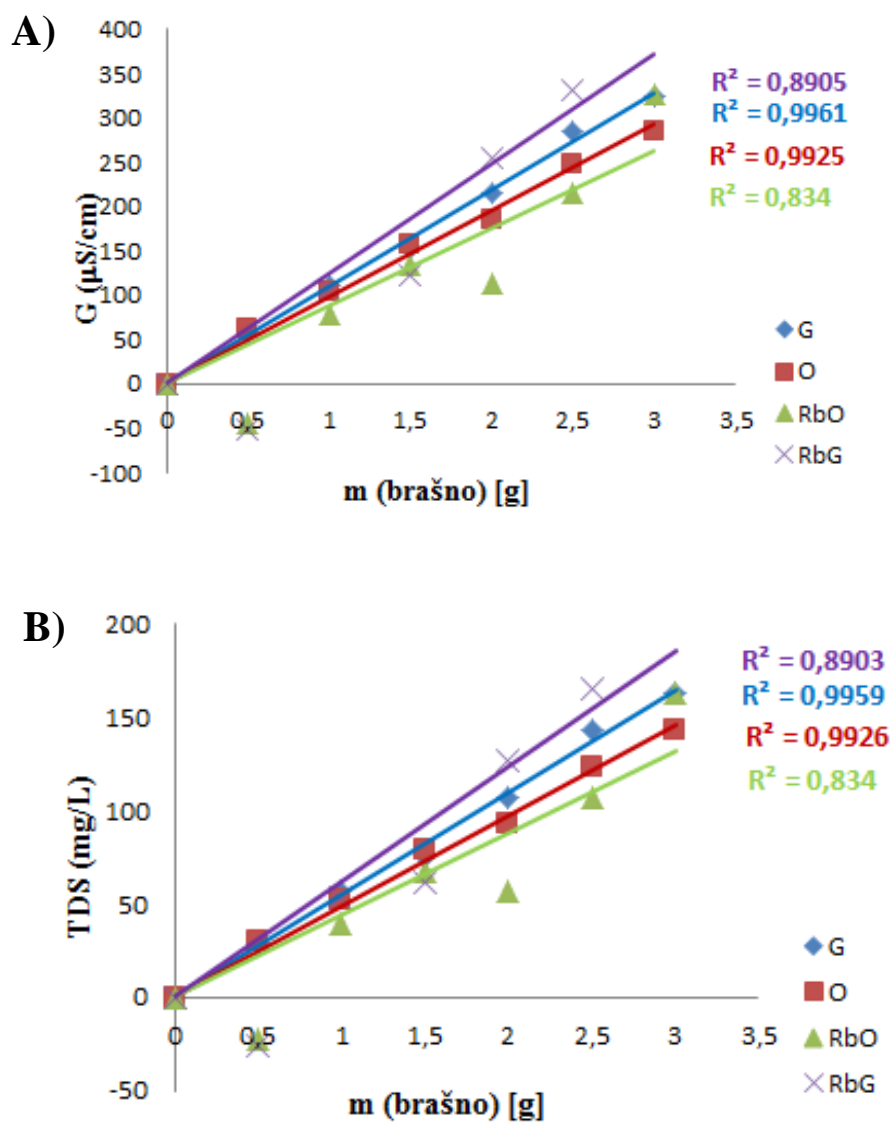
Iako su već kod praškastih uzoraka razvijeni modeli predviđanja postotka glatkog brašna u riži (slika 26) te glatkog i oštrog brašna u rižinom brašnu (slika 27, A i B), modeli istih kombinacija kod tekućih uzoraka snimanih sandom pokazuju veće koeficijente determinacije (slika 30 i slika 31, A i B). Nadalje, modeli tekućih uzoraka s rižom kao osnovom kontaminirani glatkim brašnom (slika 30 i slika 31, A) pokazuju najveće koeficijente determinacije ($R^2 = 0,996$ za rižu i $0,990$ za rižino brašno) od svih 9 modela (slike 26-32). Najmanji koeficijent determinacije pokazuje model za tekuće uzorke kukuruznog brašna kontaminiranog oštrim brašnom (slika 32).

4.4. VODLJIVOST I UKUPNE OTOPLJENE TVARI

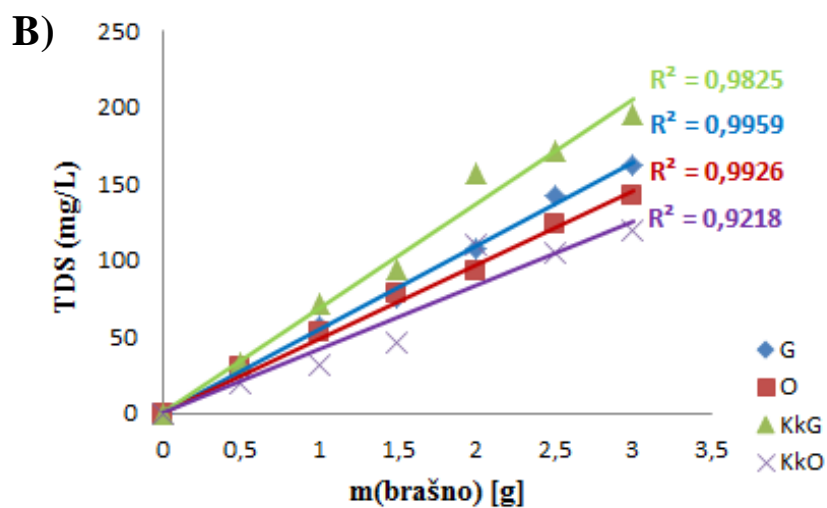
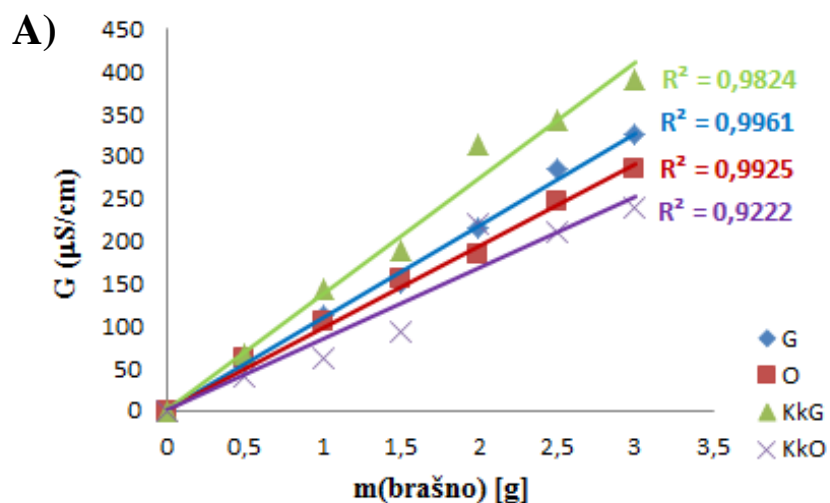
U nastavku se nalaze rezultati mjerenja vodljivosti (slike 33-36, A) i ukupnih otopljenih tvari (TDS) (slike 33-36, B) u uzorcima supernatanta odvojenog nakon taloženja tekućih uzoraka: riže (slika 33), rižinog brašna (slika 34), kukuruzne krupice (slika 35) i kukuruznog brašna (slika 36), kontaminiranih glatkim i oštrim brašnom (0-30 g). Na svim grafovima nalaze se baždarni pravci za uzorke glatkog i oštrog brašna, a kako bi svi pravci počeli od 0, kod vrijednosti za baždarnu pravce oduzete su vrijednosti vodljivosti i TDS-a za vodu, a kod uzoraka kontaminiranih sirovina vrijednosti za sirovinu bez kontaminanta s vodom. Za svaki pravac izračunat je koeficijent determinacije (R^2) koji izražava jačinu linearne povezanosti.



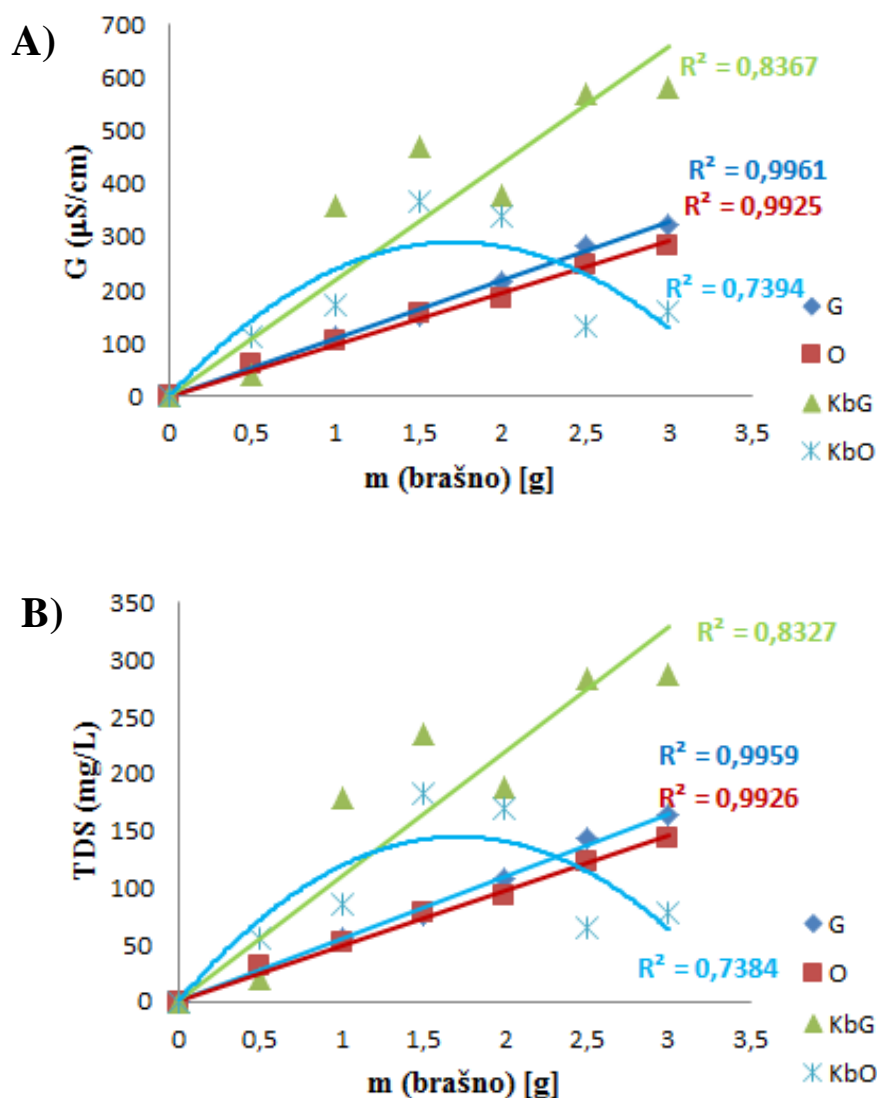
Slika 33. Ovisnost vodljivosti (A) i TDS-a (B) o masi pšeničnog brašna u uzorcima supernatanta odvojenog nakon taloženja tekućih uzoraka: **riže** kontaminirane ostrim (RO) i glatkim brašnom (RG) te ostrig (O) i glatkog (G) brašna



Slika 34. Ovisnost vodljivosti (A) i TDS-a (B) o masi pšeničnog brašna u uzorcima supernatanta odvojenog nakon taloženja tekućih uzoraka: **rižinog brašna** kontaminiranog ostrim (RbO) i glatkim (RbG) brašnom te ostrim (O) i glatkim (G) brašna



Slika 35. Ovisnost vodljivosti (A) i TDS-a (B) o masi pšeničnog brašna u uzorcima supernatanta odvojenog nakon taloženja tekućih uzoraka: **kukuruzne krupice** kontaminirane oštrim (KkO) i glatkim (KkG) brašnom te oštrog (O) i glatkog (G) brašna



Slika 36. Ovisnost vodljivosti (A) i TDS-a (B) o masi pšeničnog brašna u uzorcima supernatanta odvojenog nakon taloženja tekućih uzoraka: **kukuruznog brašna** kontaminiranog oštrim (KbO) i glatkim (KbG) brašnom te oštrog (O) i glatkog (G) brašna

Na svim grafovima (slike 33-36) uočeno je da vrijednosti TDS-a proporcionalno rastu s porastom vodljivosti te je prisutan linearni porast vrijednosti vodljivosti i TDS-a s povećanjem mase dodanog brašna u uzorcima uz iznimku kod kukuruznog brašna kontaminiranog oštrim (slika 36) gdje se vrijednosti vodljivosti i TDS-a smanjuju u uzorcima s dodana 2 grama brašna i više. Pravci za uzorke kukuruznog brašna kontaminirani glatkim brašnom (slika 36) i za uzorke rižinog brašna kontaminiranog oštrim (slika 34) imaju najmanje koeficijente determinacije (oko 0,83) te je uočeno da uzorci s kukuruznim brašnom pokazuju najveći raspon vodljivosti i TDS-a. Pravci za uzorke oštrog i glatkog brašna (slike

33-36) imaju najveće R^2 ($>0,99$), što označava najjaču linearnu vezu. Od promatranih kontaminiranih uzoraka, najjaču vezu pokazuju uzorci kukuruzne krupice kontaminirane glatkim brašnom ($R^2>0,98$) (slika 35). Slijede uzorci riže kontaminirane ostrim ($R^2>0,93$) (slika 33), kukuruzne krupice kontaminirane glatkim ($R^2>0,92$) (slika 35) i riže kontaminirane glatkim brašnom ($R^2>0,91$) (slika 34).

5. ZAKLJUČCI

1. NIR spektri uzoraka riže, rižinog brašna, kukuruzne krupice i kukuruznog brašna, kontaminirani različitim postotcima glatkog i oštrog pšeničnog brašna (5-30%) te snimljeni u rasponu valnih duljina od 904 nm do 1699 nm, bili su slabo informativni u pronalaženju razlika među njima zbog slabije apsorpcije i preklapanja apsorpcijskih vrpca. Osim toga, često su spektri bili vertikalno pomaknuti jedni od drugih čemu mogu biti razlog fizičke karakteristike uzoraka poput različite veličine čestica.
2. Analiza glavnih komponenata (PCA) uspješno je razdvojila sve uzorke već pri korištenju NIR spektara uzoraka kao ulaznih podataka, osim kod tekućih uzoraka kukuruznog brašna gdje je tek nakon korištenja podataka o apsorpciji uzoraka pri valnim duljinama 1437 nm i 1462 nm vidljivo jasno razdvajanje. Nadalje, kod obje vrste uzoraka s kukuruznim brašnom, u usporedbi s uzorcima ostalih sirovina bez glutena, bilo je najizraženije grupiranje. Osim toga, često je uočeno grupiranje uzoraka s obzirom na vrstu pšeničnog brašna kojim su kontaminirani, a kod tekućih uzoraka snimanih sondom, uzorci s više dodanog brašna uglavnom su se grupirali oko uzoraka vlažnog glutena. Prilikom računanja najvećih razlika apsorpcija između NIR spektara sirovina bez glutena i pšeničnih brašna te vlažnog glutena u tekućim uzorcima snimanim sondom, najčešće dobivene valne duljine bile su 1437 nm i 1469 nm.
3. S ciljem potencijalne predikcije postotka brašna u uzorcima (0-30%), izrađeni su linearni regresijski modeli za sve kombinacije sirovina praškastih i tekućih uzoraka snimanih sondom. Od ukupno 16 modela, 9 ih je primjenjivo, odnosno ima koeficijent determinacije (R^2) veći od 0,9. Kod praškastih uzoraka veći koeficijent determinacije imaju modeli s kukuruzom kao osnovom. Iako su kod obje vrste uzoraka razvijeni isti modeli za uzorke s rižom kao osnovom, modeli tekućih uzoraka pokazuju veće koeficijente determinacije. Kombinacije tekućih uzoraka riže s glatkim brašnom ($R^2=0,996$) i rižinog brašna s glatkim ($R^2=0,990$) imaju najveće koeficijente determinacije od svih 9 potencijalno uspješnih modela predikcije postotka pšeničnog brašna u uzorcima.

4. Ustanovljeno je da porastom mase pšeničnog brašna dodanog u tekuće uzorke riže, rižinog brašna, kukuruzne krupice i kukuruznog brašna, linearno rastu vrijednosti vodljivosti i TDS-a, uz iznimku kod kombinacije kukuruznog i oštrog brašna gdje se iste smanjuju nakon dodatka 2 ili više grama. Najčvršću linearnu vezu pokazuju uzorci s rižom i kukuruznom krupicom, a među njima uzorci kukuruzne krupice s glatkim brašnom ($R^2 > 0,98$) i uzorci riže s ostrim brašnom ($R^2 > 0,93$).
5. Kontaminacija glutenom moguća je u hrani koja prirodno ne sadrži gluten, pa čak i u hrani s oznakom „bez glutena“ na deklaraciji. To predstavlja veliki problem i ugrožava zdravlje oboljelih osoba kojima je jedina terapija bezglutenska prehrana. Iako u ovom istraživanju nisu ispitivani uzorci sa sadržajem glutena koji zadovoljava oznaku „bez glutena“ ($< 20 \text{ mgkg}^{-1}$) i „s vrlo malim sadržajem glutena“ ($< 100 \text{ mgkg}^{-1}$), dobiveni rezultati mogli bi biti od koristi za buduća istraživanja koja će se baviti izgradnjom osjetljivijih i boljih kalibracijskih modela za detekciju glutena kao kontaminanta hrane pomoću NIR spektroskopije.

6. LITERATURA

Abdi, H., Williams, L. J. (2010) Principal Component Analysis. *WIREs Comput. Stat.* **2**, 433-459.

Aït Kaddour, Cuq, B. (2011a) Dynamic NIR spectroscopy to monitor bread dough mixing: a short review. *Am. J. Food Technol.* **6**, 173-185.

Aït Kaddour, Cuq, B. (2011b) Dynamic NIR spectroscopy to monitor wheat product processing: a short review. *Am. J. Food Technol.* **6**, 186-196.

Albanell, E., Miñarro, B., Carrasco, N. (2012) Detection of low-level gluten content in flour and batter by near infrared reflectance spectroscopy (NIRS). *J. Cereal Sci.* **56**, 490-495.

Aziz, I., Branchi, F., Sanders, D. S. (2015) The rise and fall of gluten! *Proc. Nutr. Soc.* **74**, 221-226.

Badr Eldin, A. (2011) Near Infra Red Spectroscopy. U: Wide Spectra of Quality Control, (Akyar, I., ured.), InTech, Rijeka, str. 238-248.

Balakireva, A. V., Zamyatnin, A. A. (2016) Properties of Gluten Intolerance: Gluten Structure, Evolution, Pathogenicity and Detoxification Capabilities. *Nutrients* **8**:644.

Biesiekierski, J. R. (2017) What is gluten? *J. Gastroen. Hepatol.* **32**, 78-81.

Carroccio, A., Rini, G., Mansueto, P. (2014) Non-celiac wheat sensitivity is a more appropriate label than non-celiac gluten sensitivity. *Gastroenterology* **146**, 320-321.

Catassi, C., Alaedini, A., Bojarski, C., Bonaz, B., Bouma, G., Carroccio, A., Castillejo, G., De Magistris, L., Dieterich, W., Di Liberto, D., Elli, L., Fasano, A., Hadjivassiliou, M., Kurien, M., Lionetti, E., Mulder, C. J., Rostami, K., Sapone, A., Scherf, K., Schuppan, D., Trott, N., Volta, U., Zavallos, V., Zopf, Y., Sanders, D. S. (2017) The Overlapping Area of Non-Celiac

Gluten Sensitivity (NCGS) and Wheat-Sensitive Irritable Bowel Syndrome (IBS): An Update. *Nutrients* **9**:1268.

Catassi, C., Fabiani, E., Iacono, G., D'Agate, C., Francavilla, R., Biagi, F., Volta, U., Accomando, S., Picarelli, A., De Vitis, I., Pianelli, G., Gesuita, R., Carle, F., Mandolesi, A., Bearzi, I., Fasano, A. (2007) A prospective, double-blind, placebo-controlled trial to establish a safe gluten threshold for patients with celiac disease. *Am. J. Clin. Nutr.* **85**, 160-166.

Chen, J. Y., Miao, Y., Sato, S., & Zhang, H. (2008). Near infrared spectroscopy for determination of the protein composition of rice flour. *Food Sci. Technol. Res.* **14**, 132-138.

Codex Alimentarius (1979 rev. 2008) Codex standard for foods for special dietary use for persons intolerant to gluten. *CODEX STAN 118-1979*.

Čuković-Čavka, S., Crnčević Urek, M., Brinar, M., Turk, N. (2010) Celijakija u odrasloj dobi. *Medicus* **21**, 179-186.

Ćurić, D. (2013) Spoznaje o žitaricama i proizvodima iz žitarica. U: 100 (i pokoja više) crtica iz znanosti o prehrani, (Štalić, Z., ured.), Hrvatsko društvo prehrambenih tehnologa, biotehnologa i nutricionista, Zagreb, str. 57-60.

De Punder, K., Pruimboom, L. (2013) The Dietary intake of Wheat and other Cereal Grains and Their Role in Inflammation. *Nutrients* **5**, 771-787.

De Temmerman, J., Saeys, W., Nicolaï, B., Ramon, H. (2007) Near infrared reflectance spectroscopy as a tool for the in-line determination of the moisture concentration in extruded semolina pasta. *Biosyst. Eng.* **97**, 313-321.

Elli, L., Villalta, D., Rancoroni, L., Barisani, D., Ferrero, S., Pellegrini, N., Bardella, M. T., Valiante, F., Tomba, C., Carroccio, A., Bellini, M., Soncini, M., Cannizzaro, R., Leandro, G. (2017) Nomenclature and diagnosis of gluten-related disorders: A position statement by the Italian Association of Hospital Gastroenterologists and Endoscopists (AIGO). *Dig. Liver Dis.* **49**, 138-146.

Gajdoš Kljusurić, J., Mihalev, K., Bečić, I., Polović, I., Georgieva, M., Djaković, S., Kurtanjek, Ž. (2016) Near-Infrared Spectroscopic Analysis of Total Phenolic Content and Antioxidant Activity of Berry Fruits. *Food Technol. Biotechnol.* **54**, 236-242.

Gajdoš Kljusurić, J., Valinger, D., Jurinjak Tušek, A., Benković, M., Jurina, T. (2017) Application of Near Infrared Spectroscopy (NIRs), PCA and PLS models for the analysis of dried medicinal plants. U: Science within Food: Up-to-date Advances on Research and Educational Ideas, (Méndez-Vilas, A., ured.) Formatex Research Center, Badajoz, str. 28-35.

HAH (2009) Alergije podrijetlom iz hrane. HAH – Hrvatska agencija za hranu, Osijek.

Hanna Instruments (2017) Električna vodljivost, <<http://hannainst.hr/elektricna-vodljivost>>. Pristupljeno 29. svibnja 2018.

HOK (2016) Vodič za označavanje nepretpakirane hrane. HOK – Hrvatska obrtnička komora, Zagreb.

Ionescu, V., Stoenescu, G., Vasilean, I., Aprodu, I., Banu, I. (2010) Comparative evaluation of wet gluten quantity and quality through different methods. *Fasc. IV – Food Technol.* **34**, 44-48.

Jednačak, T. (2013) Razvoj metodologije vibracijske spektroskopije in-line za praćenje kemijskih reakcija i kristalizacije biološki aktivnih molekula. Doktorski rad. Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Zagreb.

Jednačak, T., Novak, P. (2013) Procesne analitičke tehnike temeljene na vibracijskoj spektroskopiji in-line i primjena u industriji. *Kem. Ind.* **62**, 71-80.

Jirka Alebić, I. (2008) Prehrambene smjernice i osobitosti osnovnih skupina namirnica. *Medicus* **17**, 37-46.

Kim, M. J., Kwak, H. S., Jung, H. Y., Lee, M. J., Kim, O. W., Kim, H., Kim, S. S., (2017) Consumer perception of bread depending on wheat origin in relation to physicochemical characteristics of wheat flour. *Emir. J. Food Agric.* **29**, 351-358.

Koerner, T. B., Cleroux, C., Poirier, C., Cantin, I., Alimkulov, A., Elamparo, H. (2011). Gluten contamination in the Canadian commercial oat supply. *Food Addit. Contam.* **28**, 705-710.

Kucek, L. K., Veenstra, L. D., Amnuaycheewa, P., Sorrells, M. E. (2015) A grounded guide to gluten: how modern genotypes and processing impact wheat sensitivity. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **14**, 285-302.

Lee, H. J., Anderson, Z., Ryu, D. (2014) Gluten Contamination in Foods Labeled as „Gluten Free“ in the United States. *J. Food Prot.* **77**, 1830-1833.

Li, R., Kawamura, S., Fujita, H., Fujikawa, S. (2013) Near-infrared spectroscopy for determining grain constituent contents at grain elevators. *EAEF* **6**, 20-26.

Ludvigsson, J. F., Leffler, D. A., Bai, J., Biagi, F., Fasano, A., Green, P. H. R., Hadjivassiliou, M., Kaukinen, K., Kelly, C., Leonard, J. N., Lundin, K. E., Murray, J. A., Sanders, D. S., Walker, M. M., Zingone, F., Ciacci, C. (2013) The Oslo definitions for coeliac disease and related terms. *Gut* **62**, 43-52.

Marti, A., Augst, E., Cox, S., Koehler, P. (2015) Correlations between gluten aggregation properties defined by the GlutoPeak test and content of quality-related protein fractions of winter wheat flour. *J. Cereal Sci.* **66**, 89-95.

Metrohm (2013) NIR Spectroscopy – a guide to near-infrared spectroscopic analysis of industrial manufacturing processes, Metrohm AG, Herisau.

Mišak, Z. (2014) Gluten u prehrani: uzrok celijakije ili nešto više. *Paediatr. Croat.* **58**, 175-179.

Mlinar, R., Ikić, I., Jukić, K., Maričević, M., Bukan, M. (2017) Bc Mandica – nova sorta ozime pšenice. *Sjemenarstvo* **30**, 35-43.

Mohammed, M. A. R. (2013) Studying the factors Affecting the Settling Velocity of Solid Particles in Non-Newtonian Fluids. *NUCEJ* **16**, 41-50.

Mrvčić, J., Mikelec, K., Stanzer, D., Križanović, S., Grba, S., Bačun-Družina, V., Stehlik-Tomas, V. (2011) Sourdough – Traditional Methods for Improving Quality of Bakery Products. *Croat. J. Food Technol. Biotechnol. Nutr.* **6**, 89-99.

Navarro, V., Fernández-Gil, M. d. P., Simón, E., Bustamante, M. Á. (2017) Gluten: General Aspects and International Regulations for Products for Celiac People. U: Nutritional and Analytical Approaches of Gluten-Free Diet in Celiac Disease. Springer, Cham, str. 15-27.

Nijeboer, P., Bontkes, H. J., Mulder, C. J. J., Bouma, G. (2013) Non-celiac Gluten Sensitivity. Is it in the Gluten or in the Grain? *J. Gastrointestin. Liver Dis.* **22**, 435-440.

Niland, B., Cash, B. D. (2018) Health Benefits and Adverse Effects of a Gluten-Free Diet in Non-Celiac Disease Patients. *Gastroenterol. Hepatol.* **14**, 82-91.

Ozaki, Y., McClure, W. F., Christy, A. A. (2007) Near-infrared spectroscopy in Food Science and Technology, John Wiley & Sons, New Jersey.

Panjkota Krbavčić, I. (2008) Prehrana kod celijakije. *Medicus* **17**, 87-92.

Panjkota Krbavčić, I. (2013) Zašto kruh boli? U: 100 (i pokoja više) crtica iz znanosti o prehrani, (Štalić, Z., ured.), Hrvatsko društvo prehrambenih tehnologa, biotehnologa i nutricionista, Zagreb, str. 136-138.

Picarelli, A., Borghini, R., Isonne, C., Di Tola, M. (2013) Reactivity to dietary gluten: new insights into differential diagnosis among gluten-related gastrointestinal disorders. *Pol. Arch. Med. Wewn.* **123**, 708-712.

Porep, J. U., Kammerer, D. R., Carle, R. (2015) On-line application of near infrared (NIR) spectroscopy in food production. *Trends food Sci. Tech.* **46**, 211-230.

Pravilnik o žitaricama i proizvodima od žitarica (2016) *Narodne novine* **81**, Zagreb.

Provedbena uredba Komisije (EU) br. 828/2014 od 30. srpnja 2014. o zahtjevima za informiranje potrošača o odsutnosti ili smanjenoj prisutnosti glutena u hrani. Službeni list Europske unije **228**, Strasbourg.

Sapone, A., Bai, J. C., Ciacci, C., Dolinsek, J., Green, P. H., Hadjivassiliou, M., Kaukinen, K., Rostami, K., Sanders, D. S., Schumann, M., Ullrich, R., Villalta, D., Volta, U., Catassi, C., Fasano, A. (2012) Spectrum of gluten – related disorders: consensus on new nomenclature and classification. *BMC Med.* **10**:13.

Scherf, K. A., Koehler, P., Wieser, H. (2016) Gluten and wheat sensitivities – An overview. *J. Cereal Sci.* **67**, 2-11.

Shewry, P. R., Halford, N. G., Belton, P. S., Tatham, A. S. (2002) The structure and properties of gluten: an elastic protein from wheat grain. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B: Biol. Sci.* **357**, 133-142.

Skenderija, M. (2010) Ukratko o brašnima..., <<https://www.podravka.hr/clanak/2001968/ukratko-o-brasnima8230>>. Pristupljeno 5. lipnja 2018.

Starčević Čizmarević, N., Mijandrušić-Sinčić, B., Licul, V., Kapović, M., Ristić, S. (2015) Geni i celijakija. *Paediatr. Croat.* **59**, 88-94.

Tack, G. J., Verbeek, W. H., Schreurs, M. W., Mulder, C. J. (2010) The spectrum of celiac disease: epidemiology, clinical aspects and treatment. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **7**, 204-213.

Verbeke, K. (2018) Nonceliac Gluten Sensitivity: What Is the Culprit? *Gastroenterology* **154**, 471-484.

Verma, A. K., Gatti, S., Galezzi, T., Monachesi, C., Padella, L., Del Baldo, G., Annibali, R., Lionetti, E., Catassi, C. (2017) Gluten Contamination in Naturally or Labeled Gluten-Free Products Marketed in Italy. *Nutrients*, **9**:115.

Volta, U., Bardella, M. T., Calabro, A., Troncone, R., Corazza, G. R. (2014) An Italian prospective multicenter survey on patients suspected of having non-celiac gluten sensitivity. *BMC Med.* **12**:85.

Volta, U., Caio, G., Tavoli, F., De Giorgio, R. (2013) Non-celiac gluten sensitivity: questions still to be answered despite increasing awareness. *Cell. Mol. Immunol.* **10**, 383-392.

Wesley, I. J., Larsen, N. G., Osborne, B. G., Skeritt, J. H. (2002) Monitoring of dough properties. US Patent 6,342,259.

Wieser, H. (2007) Chemistry of gluten proteins. *Food Microbiol.* **24**, 115-119.

Wimonsiri, L., Ritthiruangdej, P., Kasemsumran, S., Therdthai, N., Chanput, W., Ozaki, Y. (2017) Rapid analysis of chemical composition in intact and milled rice cookies using near infrared spectroscopy. *J. Near Infrared Spec.* **25**, 330-337.

IZJAVA O IZVORNOSTI

Izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristila drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Marija Radman

Marija Radman